



João Paulo Madeira Afonso

Licenciatura em Bioquímica

Recuperação de proteínas e alcaloides dos meios de adoçamento de *Lupinus albus*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientadora: Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço,
Professora auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa
Coorientadora: Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira, Professora
auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paula Cristina De Sério Branco
Arguente: Prof. Doutor Ricardo Alexandre Ventura das Chagas



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

[Novembro 2020]

Direitos de cópia

Recuperação de proteínas e alcaloides dos meios de adoçamento de *Lupinus albus*

Copyright © João Paulo Madeira Afonso, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A todos aqueles que fazem parte desta casa que é a FCT NOVA, um agradecimento profundo por todos os momentos que me proporcionaram ao longo de todo este meu ciclo académico.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Lourenço, e à minha coorientadora, Professora Doutora Luísa Ferreira por me permitirem fazer parte deste projeto e por toda a amabilidade e disponibilidade que sempre tiveram para me esclarecerem dúvidas, dar conselhos e até mesmo deixar uma palavra de ânimo, não tenho palavras para agradecer todo o apoio.

A todos os que fazem parte dos laboratórios 202 e 205 por todos os conselhos, pelos momentos ótimos que me proporcionaram, mais que colegas são amigos.

Ao laboratório de análises por todo o apoio, em especial à Carla pelas análises de ICP, à Elizabete por me arranjar sempre um espacinho no liofilizador e ao Nuno pelas análises de raio-X.

À Professora Doutora Rita Sobral, à Raquel Portela e à Professora Doutora Ana Fernando pelo uso das centrifugas.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto um muito obrigado.

Quero também agradecer a todos os meus familiares e amigos pelo apoio, em especial aos meus avós e à minha mãe que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

Ao Ruben um agradecimento especial por todo o apoio, carinho, amabilidade, companheirismo e por todos os momentos.

Resumo

O tremço branco, *Lupinus albus*, é do ponto de vista nutricional uma excelente fonte de fibra e proteína sendo por isso considerado um superalimento, contudo, a presença de alcaloides impede que este seja consumido de forma segura. A remoção destas substâncias leva à perda de proteínas destas sementes. Assim o objetivo deste projeto consiste no estudo da separação das proteínas e dos alcaloides removidos no processo de adoçamento para utilização na indústria alimentar, no que diz respeito às proteínas de origem vegetal, e obtenção de substâncias (alcaloides) que podem ser chave no desenvolvimento de novos fármacos pela sua utilização como sintão quiral na síntese de moléculas complexas.

A dicarboximetilcelulose (DCMC) é um polímero recentemente desenvolvido para a adsorção de proteínas do vinho branco, que mostrou ter uma elevada eficiência quando comparado com outros derivados da celulose, pelo que seria espectável que permitisse a separação anteriormente mencionada. Deste modo, sintetizou-se o polímero DCMC para avaliar a sua capacidade em separar, por adsorção, proteínas e alcaloides de meios aquosos de adoçamento do tremço branco. Para tal foram estudados diferentes sistemas em que se fez variar o valor de pH, não se tendo obtido resultados satisfatórios.

Sintetizou-se, a partir deste polímero (DCMC), um *MIP* (*Molecularly Imprinted Polymer*) utilizando a lupanina como *template*, e testou-se a sua capacidade de adsorver seletivamente a lupanina, separando-a dos restantes componentes da mistura. Apesar de não se ter obtido um resultado satisfatório desta forma, a descarboxilação do *MIP* obtido melhorou substancialmente o seu desempenho mostrando-se uma opção promissora.

Abstract

The white lupine, *Lupinus albus*, is nutritionally an excellent source of fiber and protein and therefore is considered a superfood, however, the presence of alkaloids prevents it from being consumed safely. The removal of these substances leads to the loss of proteins from these seeds, so the objective of this project is to study the separation of the proteins and alkaloids removed in this process for use in the food industry, regarding proteins of plant origin, and to obtain substances (alkaloids) that may be key in the development of new drugs as chiral sintons for synthesis of complex molecules.

Dicarboxymethylcellulose is a polymer recently developed for the adsorption of white wine proteins, which has shown to be highly efficient when compared to other cellulose derivatives, so it would be expected to allow the previously mentioned separation. In this way, the DCMC polymer was synthesized to assess its ability to separate, by adsorption, proteins, and alkaloids from aqueous sweetener media in the white lupine. To accomplish this, different systems were studied in which the pH value were varied, these yielded no satisfactory results.

A MIP (Molecularly Imprinted Polymer) was synthesized from this polymer (DCMC) using lupanine as a template and its ability to selectively adsorb lupanine was tested, separating it from the remaining components of the mixture, despite not obtaining a satisfactory result in this way, the decarboxylation of the obtained MIP substantially improved its performance, proving to be a promising option.

Índice

1.	Introdução	1
1.1	<i>Lupinus albus</i>	1
1.2	Alcaloides quinolizidínicos	2
1.3	Adoçamento do tremço.....	3
1.4	Diferenciação química de alcaloides e proteínas	4
1.5	Polímeros de celulose	5
1.6	<i>Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)</i>	6
2.	Parte Experimental	9
2.1	Reagentes, solventes e materiais.....	9
2.2	Síntese da DCMC	9
2.2.1	Preparação do ácido bromomalónico	9
2.2.2	Síntese do bromomalonato de sódio.....	9
2.2.3	Síntese da DCMC.....	10
2.3	Extração acídica e separação de alcaloides e proteínas do tremço	11
2.3.1	Extração em meio ácido e ensaios com DCMC	11
2.3.2	Recuperação de alcaloides/proteínas dos meios aquosos de adoçamento do tremço	12
2.3.3	Síntese de <i>MIPs</i>	15
2.3.4	Ensaio com <i>MIP</i> para adsorção seletiva da lupanina.....	16
3.	Discussão	22
3.1	Síntese da DCMC	22
3.2	Ensaio com a DCMC	25
3.3	Ensaio com <i>MIPs</i>	27
4.	Conclusão.....	32

Índice de figuras

Figura 1. 1 - Biossíntese da (+)-lupanina (Adaptado) ¹⁸	3
Figura 1. 2 - Representação estrutural da CMC e DCMC e respectivos valores de pKa.	6
Figura 1. 3 - Esquema geral de produção de um polímero molecularmente impesso (<i>MIP</i>).	7
Figura 2. 1 - Esquema de tratamento das frações obtidas da extração acídica dos alcaloides do tremoço.....	11
Figura 2. 2 - Reta de calibração de absorvância vs concentração de lupanina, a 202 nm.	16
Figura 2. 3 - Representação gráfica da difração de raio-X do <i>MIP</i> sintetizado (antes e após descarboxilação) e representação gráfica da difração de raio-X da celulose microcristalina e de um derivado de celulose (celulose fosfato) ³⁹	19
Figura 3. 1 - Esquema da síntese da DCMC.	22
Figura 3. 2 - Mecanismo de reação de bromação do ácido malónico.	22
Figura 3. 3 - Mecanismo da reação da celulose com o bromomalonato de sódio.	23
Figura 3. 4 - Mecanismo do início da reação radicalar de <i>cross-linking</i> da DCMC.	28
Figura 3. 5 - Mecanismo da reação de descarboxilação do <i>MIP</i>	29

Índice de tabelas

Tabela 2. 1 – Massa de celulose de partida (g), número de equivalentes de bromomalonato de sódio, massa de amostra (g), concentração de sódio em ppm e respetivo grau de substituição (DS) para todos os polímeros utilizados.	10
Tabela 2. 2- Massa (mg) das frações obtidas do controlo e ensaio com a DCMC.	12
Tabela 2. 3 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com a DCMC e recuperação.	13
Tabela 2. 4 - Percentagem de sódio presente na DCMC após recuperação, bem como antes dos ensaios.	13
Tabela 2. 5 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com a DCMC e recuperação.	14
Tabela 2. 6 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com o <i>MIP</i> e recuperação.	18
Tabela 2. 7 - Concentração de sódio presente nos diferentes <i>MIPs</i> quantificado por <i>ICP-AES</i>	18
Tabela 2. 8 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com o <i>MIP</i> (antes [1ª linha] e após descarboxilação [2ª linha da tabela]) e recuperação.	20

Lista de abreviaturas

^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
AGU	Unidade de anidroglicose (<i>Anhydroglucose unit</i>)
CMC	Carboximetilcelulose
CPS	Contagens por segundo
DCMC	Dicarboximetilcelulose
<i>DS</i>	<i>Degree of substitution</i>
HEMA	hidroxietil-metacrilato
<i>ICP-AES</i>	<i>Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry</i>
IV	Infravermelho
<i>MIP</i>	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
rpm	Rotações por minuto
UV-VIS	Ultravioleta-visível

1. Introdução

1.1 *Lupinus albus*

De entre as espécies conhecidas do género *Lupinus*, o tremoceiro branco, *Lupinus albus*, apresenta um grande potencial. A produção deste género de legume é cada vez mais recorrente, não só pela possibilidade de cultivo em solos pobres e sob condições adversas, mas também devido à sua utilização na nutrição animal (ração ou suplementação proteica de ruminantes) e na humana por ter um elevado teor em proteínas e óleos nas sementes. Por outro lado melhorar a fertilidade dos solos^{1,2} através da suplementação de solos pobres com compostos de azoto, por uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de azoto das classes *Bradyrhizobium* ou *Rhizobium*³ e através do incremento de matéria orgânica presente no solo. Estes factos levaram à produção mundial de 1 280 mil toneladas de tremçoço (nome popular da semente deste legume) só em 2016, 51% destas produzidas na Austrália⁴. Sendo a esmagadora maioria destas culturas composta por variedades *sweet*, (variedades selecionadas por apresentarem um teor em alcaloides inferior a 0,2%) o que torna a sua exploração muito propensa à disseminação de patógenos⁵ que levam muitas vezes a condições que põem em causa a produção do legume, como a antracnose, ameaçando a sua viabilidade económica⁶.

As sementes do tremoceiro branco apresentam um teor proteico entre 33% a 47% que varia de acordo com o genótipo e a localização geográfica. Estas são por sua vez pobres em cisteína e metionina, mas ricas em lisina tornando-se assim uma boa fonte deste aminoácido essencial. O conteúdo em gordura varia entre 6% e 13% sendo maioritariamente constituído por ácidos gordos polinsaturados. O baixo teor de amido presente (2,3%) aliado ao baixo teor de sódio e o seu elevado conteúdo em carotenoides torna estas sementes extremamente nutritivas⁷. Estas apresentam ainda uma baixa inibição da tripsina (classe de enzimas responsáveis pela ativação da quimotripsina e diversas peptidases, que por sua vez, são responsáveis e fundamentais na degradação de péptidos permitindo a sua assimilação) pelo que podem ser diretamente utilizadas após remoção dos alcaloides quinolizidínicos presentes (0,5% a 4%, maioritariamente lupanina, cerca de 70%⁸) que conferem um sabor amargo e podem provocar problemas respiratórios, cardiovasculares, neurológicos, danos no fígado^{2,9} e até mesmo a morte. Como referido anteriormente existem também variedades *sweet*, que foram conseguidas através de cruzamentos sucessivos de variedades da planta e que apresentam quantidades significativamente mais baixas de alcaloides (0,01% a 0,05% em massa)¹⁰, que permitem o consumo sem necessidade de remoção destes compostos, já que se encontram abaixo do valor máximo permitido de 200 mg de alcaloides por kg de alimento¹¹. Apesar desta clara vantagem nutricional sobre as variedades *bitter*, os alcaloides desempenham um papel

fundamental na proteção do tremoceiro, já que se mostraram letais para uma grande variedade de insetos e outro tipo de pestes, bem como capazes de inibir o crescimento de bactérias, fungos, vírus e outras plantas¹².

Apesar dos alcaloides encontrados representarem um problema no que diz respeito à indústria alimentar, também podem ser olhados como uma fonte de recursos para a indústria farmacêutica, tendo já sido descrito que estes apresentam capacidade antimutagénica, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena e anti-inflamatória⁹. Para além disto podem ainda ser utilizados como sintões quirais na síntese de moléculas mais complexas, tal como já se encontra descrito para a lupanina¹³⁻¹⁵.

Verificou-se ainda que a lupanina potencia a libertação de insulina pela glucose tornando-se um ferramenta no tratamento do diabetes tipo II¹⁶ e que a esparteína (alcaloide presente em pequena quantidade no tremço, que pode ser facilmente obtido a partir da lupanina) apresenta capacidade anticonvulsante¹⁷.

1.2 Alcaloides quinolizidínicos

Os alcaloides são a classe mais heterogénea de metabolitos secundários já que incorporam precursores de diferentes vias do metabolismo secundário. Apresentam na sua estrutura um ou mais átomos de azoto o que, usualmente, lhes confere basicidade. São assim comumente agrupados pela unidade estrutural que contém o átomo de azoto. Podem também ser categorizados pelo aminoácido de onde o átomo de azoto é originário, já que são relativamente poucos os aminoácidos que estão envolvidos na biossíntese destes compostos (arginina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina). Verifica-se ainda que a estrutura do aminoácido precursor é maioritariamente retida na estrutura do alcaloide. Contudo, alguns destes compostos adquirem o seu átomo de azoto através de uma reação de transaminação, incorporando apenas o átomo de azoto numa estrutura que pode derivar de acetato, ácido xiquímico, terpenos ou esteroides, estes designados de pseudoalcaloides¹⁸.

Os alcaloides que apresentam um núcleo de quinolizidina são normalmente encontrados em plantas da família Leguminosae/Fabaceae, e têm como função dissuadir herbívoros da sua ingestão por serem amargos e tóxicos para estes animais. O esqueleto bicíclico que estes compostos apresentam, tem origem em duas moléculas de lisina, que após descarboxilação e desaminação oxidativa, reagem intramolecularmente formando uma imina. Esta está em equilíbrio com a respetiva enamina que, por uma reação do tipo aldol entre os dois

tautómeros, leva à formação de um intermediário, o qual após hidrólise do grupo imina, uma segunda desaminação e formação de um novo grupo imina leva à formação do núcleo de quinolizidina. Pode ainda ser incorporada uma terceira molécula de lisina, sobre a forma de enamina, para a formação de tetraciclos bis-quinolizidínicos como é exemplo a lupanina¹⁸ (Figura 1.1). O controle estereoquímico da reação do tipo aldol é muito importante para a estereoquímica deste grupo de alcaloides, pois desta resulta apenas um dos quatro diastereoisómeros possíveis. Estes centros assimétricos são mantidos nas reações subsequentes, razão pela qual estes compostos, e em especial a lupanina por ser maioritária no tremoceiro branco, podem funcionar como sintões quirais de elevada complexidade na síntese de outras moléculas como referido anteriormente.

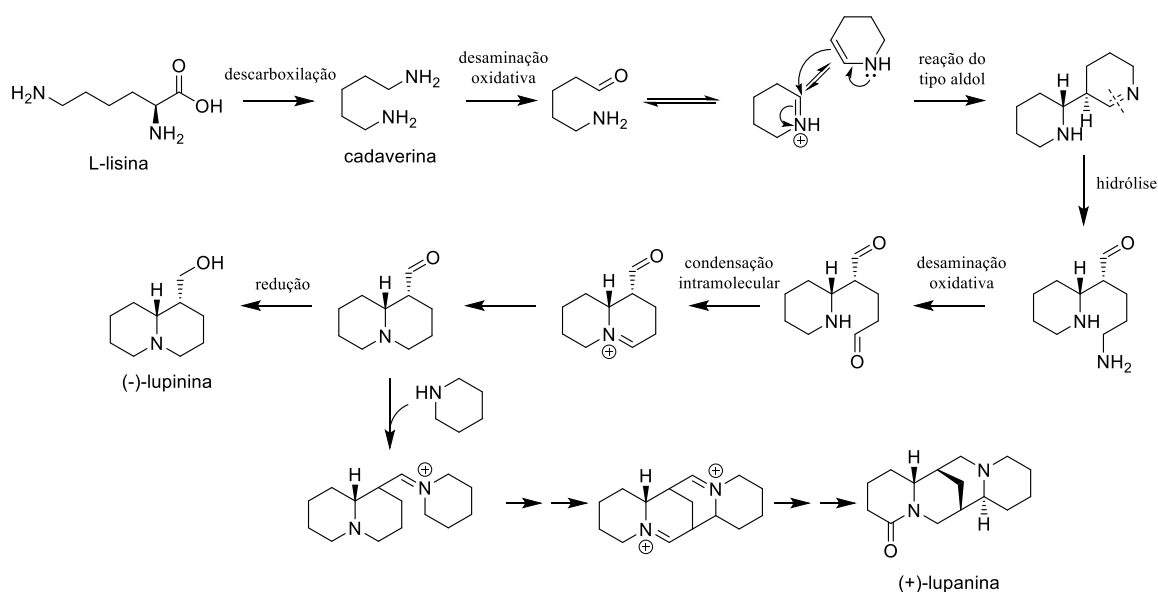


Figura 1. 1 - Biossíntese da (+)-lupanina (Adaptado)¹⁸.

1.3 Adoçamento do tremçoço

Tal como foi apresentado anteriormente, os alcaloides presentes no tremçoço conferem-lhe propriedades tóxicas e sabor amargo, assim para que possa ser consumido de forma segura, tem de se proceder à remoção destes compostos até teores que não induzam efeitos nefastos da sua ingestão (menos de 200 mg/kg). Existem na Europa duas abordagens distintas para a resolução deste problema, a primeira consiste na lavagem sucessiva das sementes com água (lixiviação), de forma a que esta retire os alcaloides presentes até uma percentagem que seja segura para consumo. Este é o método utilizado maioritariamente em Portugal e de forma pouco significativa em outros países europeus. O segundo método consiste no cultivo de tremçoceiros “*sweet*” que produzem alcaloides em quantidade pouco significativa e por isso as suas sementes não precisam de ser submetidas à lixiviação. Este método está largamente

implementado em vários países da Europa e é utilizado nas três espécies de tremoceiro cultivadas na Europa (tremoceiro branco *Lupinus albus*, tremoceiro amarelo *Lupinus luteus* e tremoceiro de folha estreita *Lupinus angustifolius*), sendo que grande parte da farinha de tremço incorporada nos alimentos que consumimos provém deste tipo de cultivo. O sucesso na aquisição de variantes *sweet* poderá ser a razão pela qual este se tornou o método predominante na Europa, já que as espécies cultivadas nos países mediterrâneos não suportavam o clima dos países mais frios, sendo que nos anos 20 do século passado Reinhold von Sengbusch conseguiu obter variantes *sweet* destas três espécies, das quais apenas os exemplares de *L. albus* não suportavam o clima dos países do norte da Europa. Assim, durante os anos seguintes vários botânicos alemães focaram-se em obter exemplares *sweet* de *L. albus* que suportassem climas mais frios culminado com o sucesso de Heuser em 1950¹⁹.

A remoção dos alcaloides pelo método de lixiviação para além de pouco eficiente leva à perda de valor nutricional destas sementes, nomeadamente perda de proteínas²⁰. Assim, o presente trabalho tem como objetivo a separação e recuperação dos alcaloides e das proteínas dos meios aquosos resultantes do processo de adoçamento. As proteínas de origem vegetal podem então ser utilizadas na indústria alimentar fazendo uso das suas capacidades emulsificantes, gelificantes e espumantes^{21,22}, e por outro lado os alcaloides isolados podem estar na base do desenvolvimento de novos fármacos já que muitos mostraram diversas atividades biológicas como referido anteriormente. Para além disto existe a possibilidade de utilização destes metabolitos, em especial da lupanina dado a sua abundância em relação aos demais, como sintões quirais fazendo uso da pureza estereoquímica e contornando a difícil síntese do anel de quinolizidina, como foi também referido anteriormente. Desta forma, pode existir a valorização destes subprodutos da produção da variedade *bitter* do tremoceiro que aliada à sua resistência natural à proliferação de microrganismos e controlo de pragas podem tornar o seu cultivo uma opção viável às variedades *sweet*.

1.4 Diferenciação química de alcaloides e proteínas

O isolamento de substâncias de extratos naturais tem como principal dificuldade a complexidade da mistura, onde esta mesma substância se encontra. Para ultrapassar esta barreira, a procura de métodos de separação seletivos e facilmente adaptáveis a cada situação é cada vez maior^{23,24}.

Na base destes métodos de separação está a diferenciação química ou física entre os compostos a separar, como por exemplo polaridade, tamanho molecular ou ponto isoelétrico. A utilização de um eletrólito, para separar os constituintes de uma mistura utilizando a diferença na carga formal que estes apresentam, para um certo valor de pH, é conhecida como permuta iónica. Neste processo as substâncias que apresentam, a este valor de pH, carga

oposta à do eletrólito são adsorvidos, sendo que os restantes ficam em solução. Assim, é possível separar diferentes constituintes da mistura ou grupos dos mesmos ao alterar o valor de pH da solução e consequentemente a carga que estes apresentam. No contexto deste projeto este tipo de separação é à partida bastante viável já que os alcaloides presentes, tal como a lupanina que apresenta um pKa de 9,1²⁵ são bases fracas enquanto que as proteínas apresentam em média um ponto isoelétrico de 4,5²⁶, valor de pH ao qual a soma da carga formal de todos os seus grupos laterais se anula. Desta forma, é expectável que a utilização de uma matriz carregada negativamente, numa solução com pH compreendido entre estes dois valores permita a separação desejada.

1.5 Polímeros de celulose

A celulose é um polissacárido presente na parede celular das plantas, que teve um papel fundamental na longa história da humanidade. Muito antes de ser descoberta a sua estrutura, este polímero estava presente nas fibras de diferentes plantas que eram utilizadas em setores importantes como a construção e a produção de tecidos. De facto, vestígios da utilização de fibras de algodão (constituídas por 90% de celulose) na produção de tecidos provam a sua utilização durante os primórdios da civilização da América do Sul (6000 AC).

Depois de ter sido descrita em 1838 por Anselme Payen, como um sólido fibroso resistente, ganhou cada vez mais importância tornando-se num importante recurso natural. É o polímero orgânico mais comum na natureza, representando cerca de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas da produção anual de biomassa, e consiste numa fonte de matéria prima sustentável, biocompatível e biodegradável. Para além disto a celulose pode sofrer uma ampla gama de funcionalizações, com base na modificação de grupos funcionais, que dão lugar a uma vasta série de produtos, com diferentes propriedades físico-químicas²⁷.

Os éteres de celulose são produzidos em grande escala e são extensivamente empregues nas mais variadas áreas da indústria. A carboximetilcelulose (CMC) faz parte deste vasto grupo de polímeros e, apesar de ter sido concebida como um substituto da gelatina, teve a sua utilização cada vez mais estendida dadas as suas propriedades únicas²⁸. De entre estas é de destacar a capacidade de se comportar, quando em solução aquosa, como um polieletrólito com um baixo grau de ionização a valores de pH baixos. Esta propriedade permite que seja utilizado na formação de complexos e permuta iónica de catiões²⁹. Assim a CMC pode ser utilizada na adsorção de sais de metais pesados e na purificação de proteínas com um ponto isoelétrico (pI) elevado, por existir maioritariamente na forma iónica para valores de pH superiores a 5, devido ao valor do seu pKa.

A dicarboximetilcelulose (DCMC) surgiu com o intuito de ultrapassar a limitação do valor de pH a que um derivado da celulose pode surgir com carga negativa, introduzindo um segundo grupo carboxilo com o objetivo de baixar o valor de pKa do produto final. Tal foi possível introduzindo na estrutura o núcleo do ácido malônico dando origem a um polímero solúvel em água para valores relativamente baixos de grau de substituição (DS) e com um pKa de 2,1 em contraste com o valor apresentado pela CMC de 3,65 (Figura 1.2). Este polímero é então passível de ser utilizado como suporte de permuta iônica em condições mais ácidas do que a CMC. Para além disso, o *cross-linking* da DCMC por transesterificação intramolecular resulta num polímero insolúvel em água que mantém a sua alta capacidade de adsorção sem a introdução de agentes de *cross-linking*³⁰ habituais como epícloridrina ou glutaraldeído que devido à sua toxicidade são de evitar na preparação de um derivado celulósico que contacte com produtos alimentares^{31,32}.

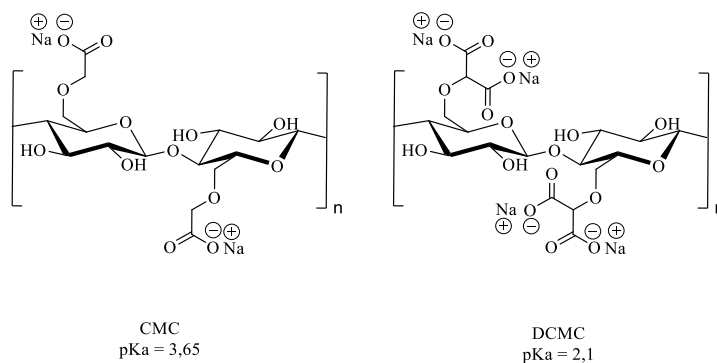


Figura 1. 2 - Representação estrutural da CMC e DCMC e respetivos valores de pKa.

1.6 Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)

Os Polímeros Molecularmente Impressos são polímeros sintetizados especificamente para uma determinada molécula alvo, baseando a sua especificidade no reconhecimento molecular e funcionando de forma análoga ao sistema biológico de anticorpo – antígeno. As metodologias de síntese destes polímeros são vastas, e dependem de diferentes parâmetros (solubilidade, compatibilidade, estabilidade) da molécula que é utilizada como *template* bem como dos diversos constituintes da malha polimérica³³. Apesar das diferentes abordagens de produção possíveis, todos os *MIPs* seguem os mesmos critérios (Figura 1.3), isto é, o polímero é produzido na presença do *template* que se encontra ligado covalentemente ou não covalentemente ao polímero. O *template* é retirado após a síntese deixando uma cavidade específica para a molécula alvo, tanto em relação à forma como à interação química. Finalmente, o polímero é exposto a uma mistura contendo a molécula alvo, permitindo que a

cavidade a capte da mistura. Estes polímeros apresentam ainda várias vantagens que torna apelativa a sua utilização, já que podem ser sintetizados polímeros específicos para praticamente todos os tipos de molécula alvo. Por serem bastante estáveis é possível armazená-los por longos períodos sem necessidades especiais e por poderem ser utilizados em diferentes ambientes químicos a diferentes temperaturas. Apresentam ainda um custo de produção relativamente baixo³³. Estas características são refletidas na crescente variedade de aplicações em que este polímeros desempenham um papel central, que vão desde o uso para adsorção de moléculas alvo em matrizes de elevada complexidade, como são exemplo o uso destes polímeros para adsorção de poluentes³³⁻³⁵ ou de adulterantes e estupefacientes³³ e também o uso para libertação controlada de fármacos^{33,36,37}. A utilização destes polímeros foi ainda explorada com a conjugação de compostos corados ou fluorescentes para utilização na deteção de explosivos, pesticidas, drogas de abuso, patogénicos, moléculas quirais e substancias carcinogénicas ou tóxicas nas mais diversas matrizes dada a sua alta especificidade³³.

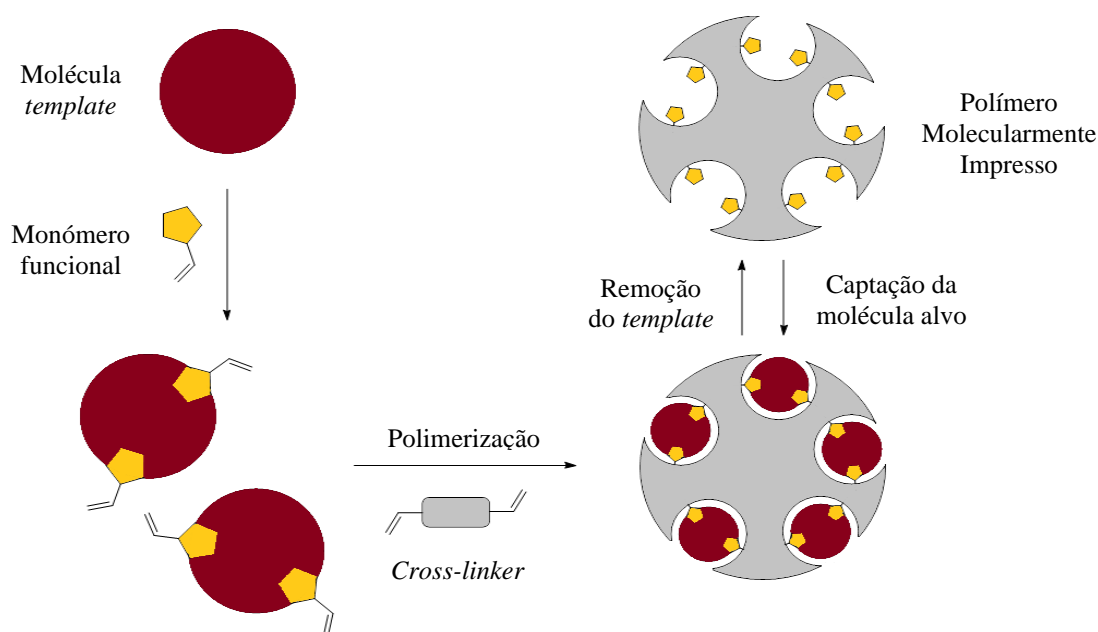


Figura 1. 3 - Esquema geral de produção de um polímero molecularmente impresso (MIP).

Neste trabalho pretendeu-se sintetizar um *MIP* que usa lupanina como template e a DCMC como espécie reativa para promover a interação química.

2. Parte Experimental

2.1 Reagentes, solventes e materiais

Os reagentes e solventes utilizados provêm da Sigma Aldrich, Merck, Honeywell e Carlo Erba. O adsorvente utilizado para isolamento dos alcaloides foi o isolute[®] HM-N da Biotage e as membranas utilizadas nos passos de diálise Spectra/Por[®] 4 *Dialysis Membrane* (MWCO: 12-14 kD) da Spectrum Labs. A sílica utilizada nas colunas cromatográficas foi a Silica gel 60A 40 – 63 μ da Carlo Erba e as placas de cromatografia de camada fina foram TLC Silica gel 60 F₂₅₄ da Merck.

O elétrico de pH utilizado foi o pH 210 da Hanna instruments. Os espectros de UV-VIS, infravermelho e RMN foram obtidos, respectivamente, por Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific, Spectrum Two FT-IR Spectrometer da Perkin Helmer e Bruker Avance ARX 400. Para os passos de centrifugação utilizou-se a Avanti[®] J-26 XPI Centrifuge da Beckman Coulter. A água ultrapura foi obtida através da Milli-Q[®] Reference Water Purification System da Merck. Os dados de difração de raio-X foram obtidos pelo MiniFlex 2 Benchtop Powder X-Ray Diffraction (XRD) Instrument da Rigaku.

2.2 Síntese da DCMC

2.2.1 Preparação do ácido bromomalônico

Adicionaram-se gota a gota 5 ml (0,09 mol) de bromo a uma solução de 9,17 g (0,088 mol) de ácido malônico seco (em pistola de secagem à temperatura ambiente durante 7 horas) em 100 ml de éter etílico, sob agitação em banho de gelo. A mistura reacional foi posteriormente deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 1 hora. O solvente foi evaporado e o resíduo foi lavado 5 vezes com 100 mL de CH₂Cl₂ e novamente seco resultando em 11,46 g (η =68%) de um pó branco.

IV (FTIR-ATR) ν (cm⁻¹): 2992 (O-H); 2830, 2659, 2557 (C-H); 1695 (C=O).

¹H RMN (400 MHz; DMSO-d₆) δ (ppm): 5,19 (s, 1H, -CBrH-).

2.2.2 Síntese do bromomalonato de sódio

O ácido bromomalônico preparado no passo anterior foi dissolvido em cerca de 70 ml de água e adicionou-se gota a gota uma solução de NaOH 40% até que a mistura atingisse um pH perto de 8. O solvente foi então evaporado dando origem a 9,14 g (η =77%) do produto pretendido.

IV (FTIR-ATR) ν (cm^{-1}): 1584 (C=O).

^1H RMN (400 MHz; D_2O) δ (ppm): 4,66 (s, 1H, -CBrH-).

^{13}C RMN (400 MHz; D_2O) δ (ppm): 173,4 (COOH), 52,2 (-CBrH-).

2.2.3 Síntese da DCMC

Suspenderam-se 5 g (0,03 mol de AGU) de celulose em 175 ml de isopropanol. À temperatura ambiente adicionaram-se gota a gota, e sob forte agitação, 5,5 ml (0,055 mol, 1,8 eq) de solução aquosa de NaOH 40%. A mistura foi deixada sob agitação durante 1 hora, ao fim da qual foi adicionada uma solução de 2,80 g (0,012 mol, 0,4 eq) de bromomalonato de sódio em 18 ml de água, ao meio reacional. Esta mistura foi mantida sob agitação vigorosa num banho a 60 °C durante 5 horas. Após este tempo filtrou-se e o filtrado foi ressuspensionado numa solução aquosa de metanol 70% e novamente filtrado. A este, adicionaram-se 50 mL de solução de NaCl 1 M sob agitação durante 30 minutos. O precipitado foi dialisado durante 3 dias contra água MilliQ com trocas de água diárias e finalmente seco dando origem a 4,86 g (η =80% em massa) de um pó branco. Este foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e ICP-AES (para determinação do grau de substituição através do doseamento de sódio).

IV (FTIR-ATR) ν (cm^{-1}): 3336 (O-H); 2898 (C-H); 1593 (C=O).

Esta reação foi repetida utilizando diferentes proporções de bromomalonato de sódio para obter polímeros com diferentes graus de substituição (Tabela 2.1). Foram ainda feitos *scale ups* partindo de 20 g de celulose.

Tabela 2. 1 – Massa de celulose de partida (g), número de equivalentes de bromomalonato de sódio, massa de amostra (g), concentração de sódio em ppm e respetivo grau de substituição (DS) para todos os polímeros utilizados.

Massa de celulose de partida (g)	Número de equivalentes de bromomalonato de sódio	Massa de amostra (mg)	Concentração de Na^+ (ppm)	Grau de substituição
5	0,4	4,2	2019	0,01
5	0,25	4,2	1644,7	0,06
20	0,3	4	2158,2	0,08
20	0,3	4,6	1873,8	0,07
20	3,0	5,3	9229,1	0,46

2.3 Extração acídica e separação de alcaloides e proteínas do tremçoço

2.3.1 Extração em meio ácido e ensaios com DCMC

Pesaram-se 30 g de tremçoço moído e adicionaram-se 100 mL de uma solução de ácido acético 1 M. Esta mistura foi mantida sob agitação durante 30 minutos e posteriormente centrifugada durante 20 minutos a 12 000 rpm (22,095 g). O sobrenadante foi recolhido e dividido em duas partes iguais. Uma foi colocada em contacto com 1 g de DCMC sob agitação durante 24 horas e a outra foi mantida como controlo. Após remoção, por filtração, da DCMC as duas frações foram novamente divididas em duas partes iguais, dando origem a quatro frações para posterior tratamento (Figura 2.1).

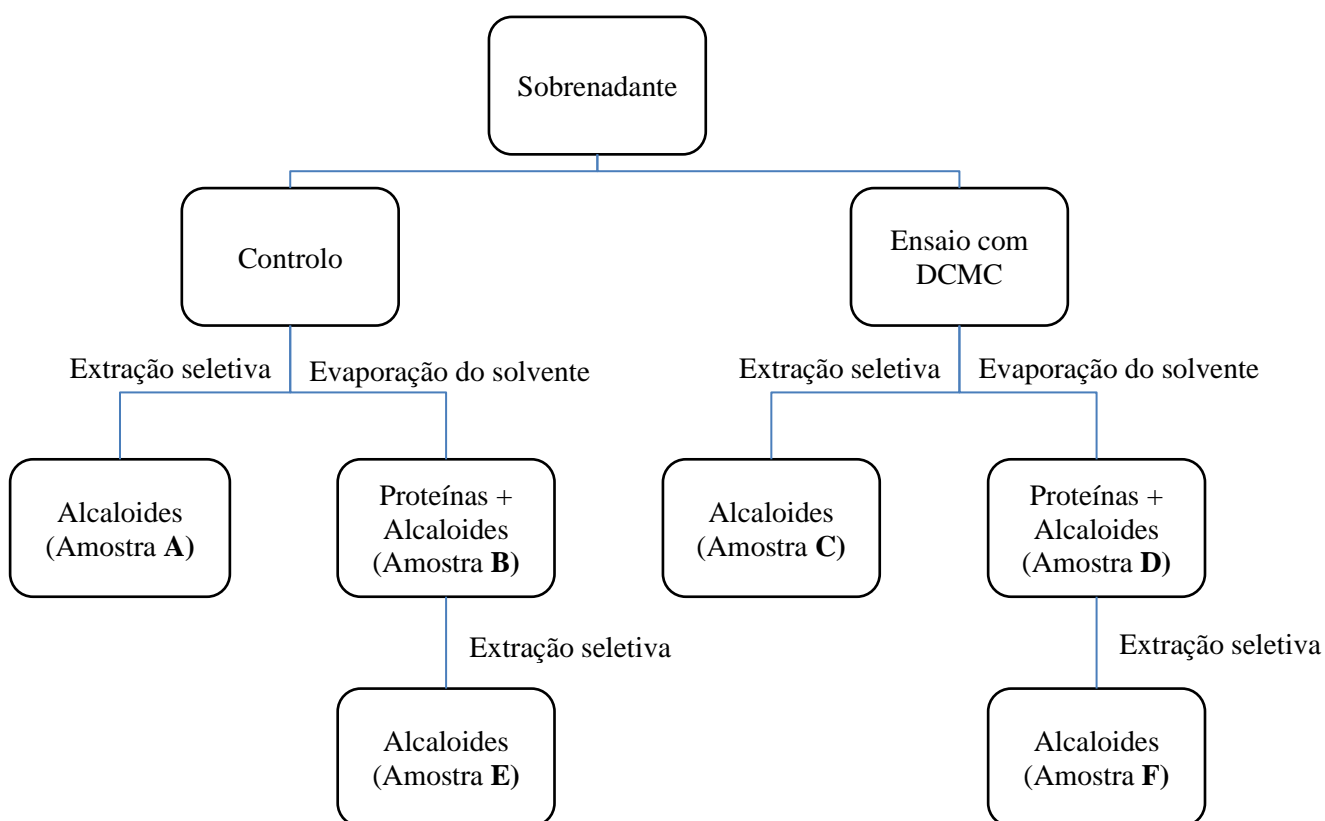


Figura 2. 1 - Esquema de tratamento das frações obtidas da extração acídica dos alcaloides do tremçoço.

Uma das frações controlo teve o seu solvente evaporado e pesado (Amostra **B**) enquanto a outra foi basificada utilizando amónia, de forma a tornar os alcaloides neutros. A mistura neutralizada foi então adsorvida numa coluna contendo isolute® (0,8 g do mesmo por mL de solução) e eluída com diclorometano (3,8 mL por mL de solução) de forma a extrair os alcaloides da amostra. A solução foi levada à secura por evaporação a pressão reduzida e pesada (Amostra **A**). Para as duas frações de tratamento com o polímero após filtração,

seguiu-se o mesmo procedimento originando as amostras **C** (alcaloides) e **D** (alcaloides + proteínas). Como forma de confirmar os dados obtidos, as amostras **B** e **D** que foram evaporadas após pesagem foram novamente dissolvidas e sofreram também o tratamento com isolute[®] originando as amostras **E** (para o controlo) e **F** (para o extrato em contacto com a DCMC). Todas estas frações foram secas e pesadas para permitir a quantificação de alcaloides e proteínas. Este processo foi repetido para exposição ao polímero a diferentes valores de pH para cada um dos polímeros preparados.

2.3.2 Recuperação de alcaloides/proteínas dos meios aquosos de adoçamento do tremçoço

Os valores da massa da primeira série de ensaios, bem como do respetivo controlo, são apresentados na tabela 2.2.

Tabela 2. 2- Massa (mg) das frações obtidas do controlo e ensaio com a DCMC.

pH	Controlo			pH	Ensaio com DCMC Análise dos compostos não adsorvidos		
	Alcaloides Amostra A (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra B (mg)	Alcaloides Amostra E (mg)		Alcaloides Amostra C (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra D (mg)	Alcaloides Amostra F (mg)
3,5	134,2	1200	139,8	2,04 (26,2 °C)	116	1170	99,1
	122	790	104,6	2,52 (25,1 °C)	73,1	660	56,8
	110	1260	142,3	3,05 (28,1 °C)	100	660	84,3
	140	1020	100	3,5 (26,4 °C)	100	980	90
	140	1540	144,4	4,01 (27,6 °C)	110	1630	162,3
	155,1	1300	185,9	4,51 (27,4 °C)	161,9	1480	158,8

Na segunda série de ensaios iniciou-se o passo de recuperação dos compostos adsorvidos à DCMC. Para tal, o polímero utilizado foi colocado sob agitação durante 24 horas numa solução de NaCl 1 M de forma a libertar o que estivesse a ele adsorvido. A mistura foi filtrada e dividida em duas frações uma das quais foi tratada com isolute® (Amostra **H**) enquanto a outra, após um passo de diálise, teve o solvente evaporado (Amostra **G**). O valor da massa da segunda série de ensaios bem como do respetivo controlo e recuperação são apresentados na tabela 2.3.

Tabela 2. 3 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com a DCMC e recuperação.

pH	Controlo			pH	Ensaio com DCMC				
	Alcaloides Amostra A (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra B (mg)	Alcaloides Amostra E (mg)		Análise dos compostos não adsorvidos			Recuperação dos compostos adsorvidos	
					Alcaloides Amostra C (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra D (mg)	Alcaloides Amostra F (mg)	Proteínas Amostra G (mg)	Alcaloides Amostra H (mg)
3,5	74	980	78,3	2,56 23,3 °C	13,5	540	62,7	104,4	29,2
	63,7	870	55,9	2,56 23,9 °C	69,1	680	68,3	62,2	23,4
	31,7	790	23,2	2,57 22,5 °C	64,1	550	41,8	52,8	9,4
	30,9	680	68,8	3,47 23,3 °C	34,3	420	38,4	63,6	22,6
	43,5	700	50,8	3,42 22,9 °C	27,7	470	51,8	5,2	24,6
	49,9	700	42,8	3,42 22,9 °C	51	425	31,2	37,8	19,6
	49,2	770	60,6	4,43 22,8 °C	48,3	340	31	51	8,8
	42,4	690	66,3	4,40 22,7 °C	40,9	1050	20,1	16,4	13
	68,4	690	23,4	4,55 23,5 °C	78,5	443	25,7	39,6	8,6

A percentagem de sódio, em ppm, presente no polímero após utilização e recuperação bem como o valor do mesmo polímero antes da utilização está presente na tabela 2.4.

Tabela 2. 4 - Percentagem de sódio presente na DCMC após recuperação, bem como antes dos ensaios.

pH	Concentração de Na ⁺ (ppm)
----	---------------------------------------

DCMC inicial		21582
2,56	23,3 °C	10806
2,56	23,9 °C	7604
2,57	22,5 °C	4483
3,47	23,3 °C	15973
3,42	22,9 °C	8582
3,42	22,9 °C	5235
4,43	22,8 °C	16060
4,40	22,7 °C	15346
4,55	23,5 °C	7291

O valor da massa da terceira série de ensaios bem como do respectivo controlo e recuperação são apresentados na tabela 2.5.

Tabela 2. 5 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com a DCMC e recuperação.

pH	Controlo			pH	Ensaio com DCMC				
	Alcaloides Amostra A (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra B (mg)	Alcaloides Amostra E (mg)		Análise dos compostos não adsorvidos			Recuperação dos compostos adsorvidos	
					Alcaloides Amostra C (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra D (mg)	Alcaloides Amostra F (mg)	Proteínas Amostra G (mg)	Alcaloides Amostra H (mg)
3,5	51,3	811,6	43,8	6,03 21,4 °C	26,6	681,6	18,2	43,8	21,2
	117,9	977,4	51	6,02 21,4 °C	79,2	1590,5	62,7	14,6	16,2
	87,3	1095,8	42,3	5,95 22,2 °C	108	1481,3	14,9	18	12,8
	65,7	286,7	9,2	6,46 20,5 °C	36,5	111,6	26,6	35,8	14,4
	33,9	757,6	38,2	6,70 21,7 °C	27,4	871,6	25,7	23,8	17
	33,5	637,7	44,3	6,43 23,6 °C	28,1	924,3	27,9	14,4	10,4

2.3.3 Síntese de MIPs

O primeiro passo consistiu na obtenção de lupanina para síntese do polímero, para isso, procedeu-se à purificação de uma mistura de alcaloides isolada de *Lupinus albus* obtida em trabalhos anteriores.

2.3.3.1 Purificação da lupanina

A purificação de 1,5 g da mistura de alcaloides foi levada a cabo através de cromatografia por coluna de sílica *flash* eluída com diclorometano/metanol 19/1 contendo 1% de amónia. Obtiveram-se 795 mg de lupanina pura, cuja estrutura foi posteriormente confirmada por comparação do espectro de ^1H RMN com a literatura³⁸.

^1H RMN (400 MHz; CDCl_3) δ (ppm): 4,13 (d, 1H, H-10eq); 2,96 (m, 1H, 6); 2,48 (m, 1H, H-17eq); 2,40 (d, 1H, H-3eq); 2,15 (d, 1H, H-8eq); 2,08 (m, 1H, H-3ax); 1,95 (m, 1H, H-15ax); 1,83 (m, 1H, H-17ax); 1,71 (d, 1H, H-11); 1,57 (m, 2H, H-13eq, H-14ax); 1,49 (m, 1H, H-7); 1,42 (m, 1H, H-14eq); 1,33 (m, 1H, H-12ax); 1,28 (m, 3H, H-5e, H-9, H-12eq); 1,17 (s, 1H, H-4ax); 1,00 (m, 1H, H-5ax); 0,88 (s, 1H, H-8ax).

2.3.3.2 Síntese do MIP

Começou-se por sintetizar DCMC solúvel em água. Para tal seguiu-se o processo de síntese descrito anteriormente utilizando 3 equivalentes de bromomalonato de sódio. O grau de substituição calculado a partir da percentagem de sódio obtida por *ICP-AES* foi de 0,46.

IV (FTIR-ATR) ν (cm^{-1}): 3320 (O-H); 1610 (C=O).

Adaptando um protocolo da literatura³⁷, dissolveram-se 47,18 mg (0,19 mmol) de lupanina em 4 mL de água num balão de 2 tubuladuras. Adicionou-se 54,02 mg (0,76 mmol, 4 eq) de acrilamida e a mistura foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Foram então adicionados 100 mg (0,38 mmol, 4 eq de grupos carboxilo) de DCMC à mistura reacional, que continuou sob agitação até completa dissolução. A solução foi então desgaseificada com azoto durante 20 minutos, seguida de adição de 121,4 mg (0,532 mmol, 0,7 eq por grupo carboxilo) de persulfato de amónio. A mistura foi mantida sob agitação durante 30 minutos, ao fim dos quais foram adicionados 0,476

ml (3,8 mmol, 20 eq) de hidroxietil-metacrilato (HEMA). A reação foi deixada sob agitação, a 60 °C e sob atmosfera inerte até ao dia seguinte. O polímero resultante foi esmagado e lavado várias vezes com água destilada, etanol e acetona. A remoção da lupanina foi feita em três etapas, extração com acetona num sistema de Soxhlet durante 24 horas, depois de seco o polímero foi novamente moído e deixado sob agitação numa solução aquosa 1 M de ácido acético durante 24 horas, e finalmente a extração em Soxhlet com acetona foi repetida durante 4 ciclos. Obtiveram-se 273 mg de um sólido branco.

IV (FTIR-ATR) ν (cm⁻¹): 3406 (O-H); 2946 (C-H); 1705 (C=O).

2.3.4 Ensaios com *MIP* para adsorção seletiva da lupanina

Para avaliar a capacidade de adsorção do polímero foi preparada uma solução aquosa de lupanina para obtenção do espectro de UV-VIS. Prepararam-se três soluções padrão em água a partir desta com concentrações $8,4 \times 10^{-5}$ M, $3,4 \times 10^{-5}$ M e $1,3 \times 10^{-5}$ M e traçou-se uma reta de calibração seguindo a absorvância a 202 nm (Figura 2.2). A 5 mL da solução padrão mais concentrada da reta ($8,4 \times 10^{-5}$ M) adicionou-se 10,9 mg do *MIP*. Agitou-se durante 24 horas e de seguida a mistura foi filtrada. Leu-se a absorvância da solução resultante, obteve-se o valor 0,300, através do qual se calculou a concentração da solução como sendo $3,9 \times 10^{-5}$ M. Assim, 10,9 mg de polímero adsorveram 0,056 mg de lupanina, o que corresponde a 0,5% em massa de lupanina absorvida.

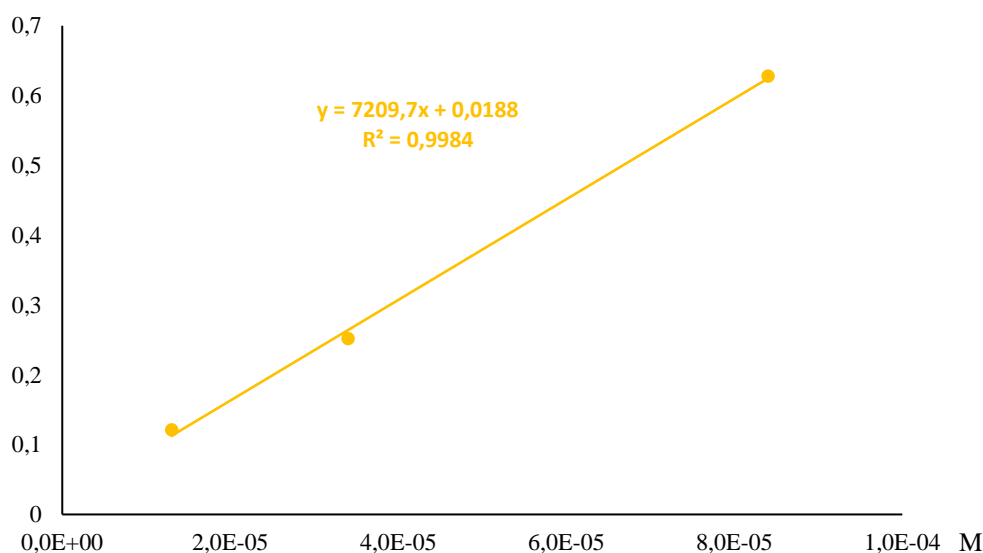


Figura 2. 2 - Reta de calibração de absorvância vs concentração de lupanina, a 202 nm.

Repetiu-se ainda o a síntese do *MIP* partindo de 1 g de DCMC e ajustando as quantidades dos restantes reagentes de acordo com a estequiometria apresentada. O polímero obtido

foi então macerado e lavado com água destilada, acetona e etanol, e foi deixado num sistema de Soxhlet, em solução aquosa 1 M de ácido acético durante 24 horas para remover a lupanina e em seguida lavado e seco obtendo-se 2,1 g de um sólido branco.

Os valores da massa da primeira série de ensaios como o *MIP* sintetizado com o *scale up*, bem como do respetivo controlo e recuperação, são apresentados na tabela 2.6. Nestes ensaios foi realizada uma segunda recuperação com solução de ácido acético 1 M para remoção completa da lupanina adsorvida (Amostra **I**).

Tabela 2. 6 - Massa (mg) das frações obtidas do controle, ensaio com o *MIP* e recuperação.

pH	Controlo			pH	Ensaio com <i>MIP</i>					
					Análise dos compostos não adsorvidos			Recuperação dos compostos adsorvidos		
	Alcaloides Amostra A (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra B (mg)	Alcaloides Amostra E (mg)		Alcaloides Amostra C (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra D (mg)	Alcaloides Amostra F (mg)	Proteínas Amostra G (mg)	Alcaloides Amostra H (mg)	Alcaloides Amostra I (mg)
3,5	45	1085	49,8	6,14 29,6 °C	43,7	1509	26,2	35,4	12,4	1,4
	25,7	744,8	31,4	6,58 26,0 °C	40,6	2815,4	21,8	34,6	11	1,3

2.3.4.1 Descarboxilação do *MIP*

A uma solução de carbonato de sódio a pH 8 adicionou-se 1 g do *MIP* sintetizado. A mistura foi deixada sobre agitação e em refluxo durante 1 hora, filtrou-se a mistura e o polímero obtido foi posteriormente seco resultando em 862 mg de um sólido branco.

IV (FTIR-ATR) ν (cm⁻¹): 3383 (O-H); 2943 (C-H); 1705 (C=O).

Para a caracterização do *MIP* e de forma a confirmar o sucesso da reação de descarboxilação foram feitas análises de difração de raio-X (Figura 2.3) e *ICP-AES* (Tabela 2.7).

Tabela 2. 7 - Concentração de sódio presente nos diferentes *MIPs* quantificado por *ICP-AES*.

	<i>MIP</i>	<i>MIP</i> descarboxialdo
Na ⁺ (ppm)	966,3	2059,0

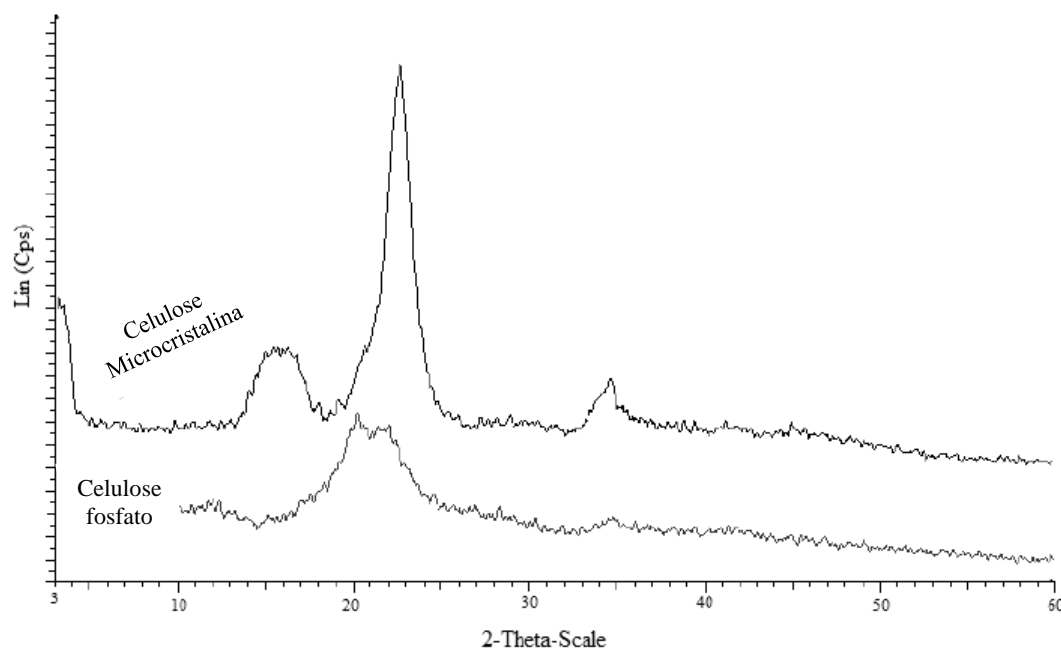
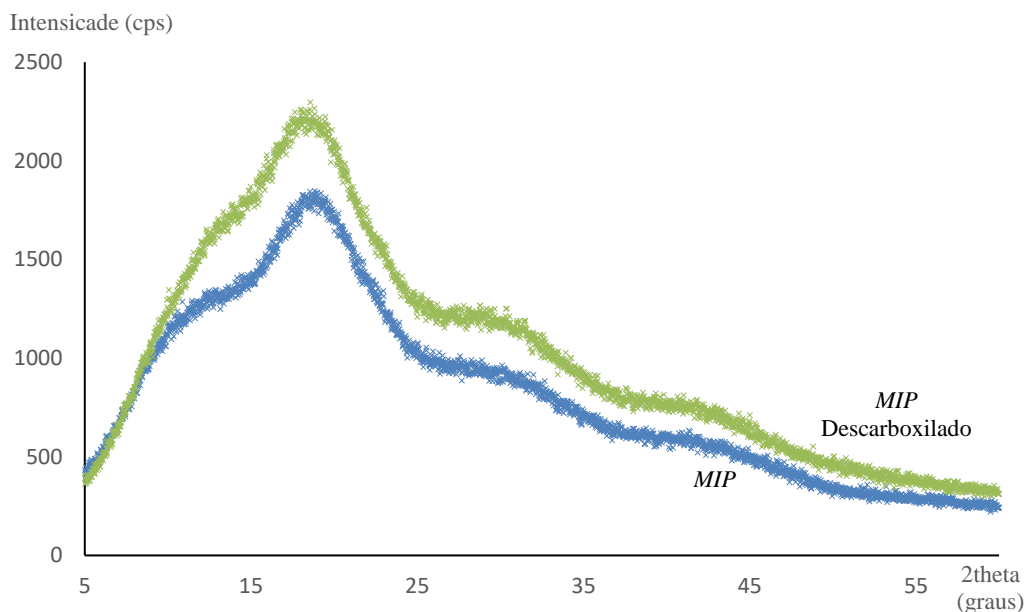


Figura 2. 3 - Representação gráfica da difração de raio-X do *MIP* sintetizado (antes e após descarboxilação) e representação gráfica da difração de raio-X da celulose microcristalina e de um derivado de celulose (celulose fosfato)³⁹.

Foi então realizado um ensaio em que o extrato foi dividido em três partes iguais controle, ensaio com 500 mg de *MIP* e ensaio com 500 mg de *MIP* após descarboxilação, esta foi a única alteração à metodologia anteriormente apresentada. Em relação ao passo de recuperação após a remoção dos compostos adsorvidos com a solução aquosa de NaCl utilizada nos restantes ensaios, foi ainda feita uma segunda extração com uma solução aquosa 1 M de ácido acético tal como foi feito para o primeiro ensaio com o *MIP*. O valor

da massa deste ensaio bem como do respetivo controlo e recuperação são apresentados na tabela 2.8.

Tabela 2. 8 - Massa (mg) das frações obtidas do controlo, ensaio com o *MIP* (antes [1ª linha] e após descarboxilação [2ª linha da tabela]) e recuperação.

pH	Controlo			pH	Ensaio com <i>MIP</i>					
	Alcaloides Amostra A (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra B (mg)	Alcaloides Amostra E (mg)		Análise dos compostos não adsorvidos			Recuperação dos compostos adsorvidos		
					Alcaloides Amostra C (mg)	Proteínas e Alcaloides Amostra D (mg)	Alcaloides Amostra F (mg)	Proteínas Amostra G (mg)	Alcaloides Amostra H (mg)	Alcaloides Amostra I (mg)
3,5	23	704,3	28,8	6,03 21,4 °C	47,1	1317,0	21,3	4,8	2,4	1,2
				6,02 21,4 °C	46,2	1164,2	25,1	3,8	3,2	1,9

3. Discussão

3.1 Síntese da DCMC

O primeiro passo do presente trabalho consistiu na síntese de um polímero de celulose capaz de adsorver as proteínas ou alcaloides presentes nos extratos de tremoço (Figura 3.1). A separação destes dois componentes presentes nos meios aquosos de adoçamento do tremoço permitirá repor o valor nutricional do tremoço após adoçamento e a utilização dos alcaloides para fins específicos. Para tal procedeu-se à eterificação dos grupos hidroxilo da celulose com um derivado do ácido malónico, dando origem à dicarboximetilcelulose e completando assim o primeiro objetivo proposto. Partindo da celulose e do ácido malónico esta síntese é composta por três passos, bromação do ácido malónico, formação do sal de sódio do produto anterior e eterificação da celulose utilizando o sal preparado.

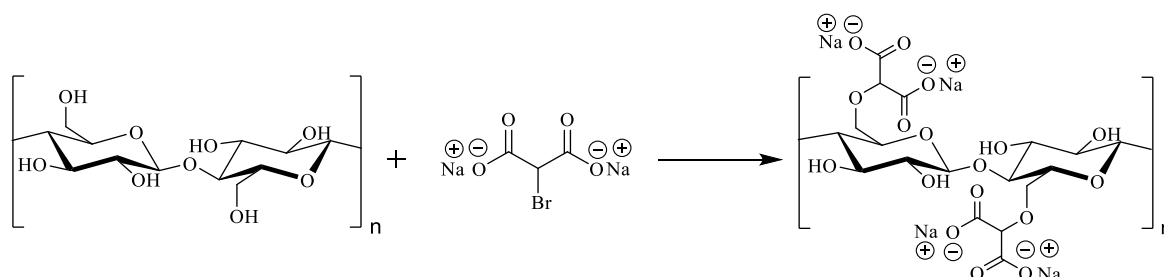


Figura 3. 1 - Esquema da síntese da DCMC.

O primeiro passo da síntese baseia-se no tautomerismo ceto-enólico do ácido malónico, que na sua forma enólica ao restabelecer o carbonilo leva à captação de um átomo de bromo pelos eletrões da ligação π levando assim à formação do produto pretendido bem como à formação de ácido bromídrico que desloca o equilíbrio para a forma enólica catalisando toda a reação (Figura 3.2).

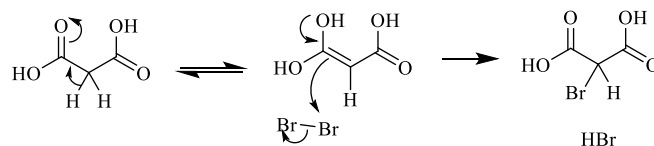


Figura 3. 2 - Mecanismo de reação de bromação do ácido malónico.

O produto isolado como um sólido branco mostra um espetro de ^1H RMN concordante com a presença do ácido e da ligação C-Br uma vez que é observável um único sinal a 5,19 ppm²⁹ enquanto que o ácido malónico apresenta o sinal do seu grupo CH_2 a cerca de 3 ppm⁴⁰.

O sal de sódio deste composto apresenta o desvio das suas bandas de carbonilo de 1694 cm^{-1} para 1584 cm^{-1} o que é compatível com a transformação dos ácidos carboxílicos em grupos carboxilato assim como desvio do sinal no espectro de ^1H RMN para campo mais alto (4,66 ppm) devido ao aumento de densidade eletrônica da substância.

Após formação do sal de sódio do ácido preparado, a reação de síntese da DCMC inicia-se com a ativação dos grupos hidroxilo da celulose levando à formação de uma pequena percentagem de grupos alcóxido, estabilizados pela presença dos iões de sódio. Após a adição do bromomalonato de sódio, os grupos alcóxido formados atacam o carbono alfa expulsando o átomo de bromo, formando assim o polímero pretendido através de uma reação de substituição (Figura 3.3).

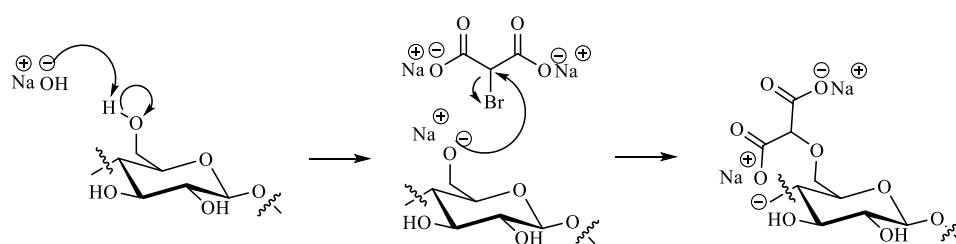


Figura 3. 3 - Mecanismo da reação da celulose com o bromomalonato de sódio.

Após filtração do polímero resultante, a este foi adicionada a uma solução aquosa 1 M de NaCl para garantir que todos os grupos carboxilato tinham o sódio como contra ião seguindo-se assim para a sua purificação para remover sais e vestígios de materiais de partida que possam ainda existir. A purificação de substâncias de misturas coloidais torna os processos de filtração e decantação pouco eficazes e muitas vezes morosos. Este tipo de misturas é muito importante na indústria alimentar com o uso de espessantes e gomas que garantem textura e coesão a alguns alimentos. Assim, técnicas de diálise são de forma geral uma opção viável para a purificação de misturas coloidais, pois permitem a remoção de sais e pequenas moléculas dependendo da porosidade da membrana utilizada. A diálise é uma técnica que tem como base o equilíbrio osmótico de duas soluções em contacto, servindo-se da diferença do tamanho das partículas nas diferentes soluções e da utilização de uma película de porosidade adequada, que permite aos solventes e a pequenas moléculas movimentarem-se entre as duas soluções até atingirem o equilíbrio, reduzindo progressivamente a sua concentração na solução a purificar. É técnica de excelência na purificação de proteínas já que não requer a remoção do solvente ou recurso a condições agressivas que poderiam pôr em causa a estrutura dos compostos presentes. Na purificação de polímeros, e substâncias que formam géis, a diálise é também uma técnica largamente empregue, já que a filtração é também muito difícil,

permitindo assim a remoção de sais e materiais de partida tais como monómeros ou agentes de funcionalização, de forma simples⁴¹.

O polímero resultante apresenta no seu espectro de infravermelho uma banda a 1593 cm⁻¹ indicando a presença de um grupo carboxilato, tal como foi discutido anteriormente. Assim, é possível confirmar o sucesso da reação de eterificação da celulose, já que esta não apresenta grupos carbonilo.

De forma a poder calcular o rendimento da síntese do polímero é necessário ter em conta dois fatores. Por um lado, um dos reagentes, a celulose, é ela própria um polímero pelo que as suas cadeias podem apresentar diferentes números de monómeros, por isso para que se possa calcular o número de moles de uma certa massa de celulose consideramos a massa molecular do seu monómero desidratado (AGU) já que esta é a unidade repetitiva ao longo da cadeia polimérica. O outro fator a ter em conta é o grau de substituição do polímero final, já que para o cálculo do número de moles da DCMC, temos como base a massa molecular da AGU com adição da massa molecular do malonato de sódio multiplicada pelo grau de substituição (DS), ou seja, o número de grupos hidroxilo funcionalizados por unidade de glucose. O rendimento global desta síntese foi assim de 42%.

O grau de substituição do polímero foi calculado tendo por base a quantificação de sódio obtida por *ICP-AES* e utilizando a seguinte fórmula³⁰:

$$DS = \frac{162 \times \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right)}{100 - \left(147 \times \frac{\%Na}{2 \times 23} \right)}$$

A equação anterior pode ser deduzida facilmente já que a percentagem de sódio da amostra (%Na) pode ser expressa como 100 vezes a razão entre a massa molar dos iões de sódio de uma dada AGU substituída com um dado grau de substituição (DS) e a massa molar dessa mesma unidade. Ou seja, temos que:

$$\%Na = 100 \frac{MM_{Na^+}}{MM_{unidade}}$$

Podemos ainda expressar estas duas massas molares à custa do grau de substituição com base na massa molar de uma AGU (162 g/mol) e do aumento causado pela adição de um grupo

malonato à mesma (147 g/mol), é também importante lembrar que cada grupo malonato comporta dois iões de sódio, temos então:

$$MM_{unidade} = 162 + 147DS \quad e \quad MM_{Na^+} = 2 \times 23 \times DS$$

Substituindo agora a equação anterior temos:

$$\begin{aligned} \%Na &= 100 \frac{2 \times 23 \times DS}{162 + 147DS} \equiv \frac{\%Na}{2 \times 23} = \frac{100DS}{162 + 147DS} \equiv \\ &\equiv \frac{\%Na}{2 \times 23} (162 + 147DS) = 100DS \equiv 162 \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right) = 100DS - 147DS \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right) \equiv \\ &\equiv 162 \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right) = DS \left(100 - 147 \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right) \right) \equiv DS = \frac{162 \times \left(\frac{\%Na}{2 \times 23} \right)}{100 - \left(147 \times \frac{\%Na}{2 \times 23} \right)} \end{aligned}$$

Chegamos assim à equação inicial utilizada para o cálculo do grau de substituição dos polímeros de DCMC.

Todos os polímeros utilizados apresentam graus de substituição semelhantes com exceção do último, o que é expectável já que foi sintetizado com um número de equivalentes de bromomalonato de sódio muito superior aos restantes (3 equivalentes).

3.2 Ensaio com a DCMC

Os primeiros ensaios realizados com a DCMC tiveram como objetivo encontrar valores de pH ótimos para o trabalho futuro. Assim foram feitos ensaios com valores de pH desde 2 a 4,5 com variações de 0,5 entre cada ensaio, já que nestes valores de pH quer as proteínas quer os alcaloides encontram-se protonados sendo por essa razão atraídos pelas cargas negativas do polímero.

As diferenças entre a massa obtida no controlo (Amostras **A** e **B**) e o respetivo ensaio (Amostras **C** e **D**) mostram que o polímero é capaz de adsorver proteínas bem como alcaloides e que variações no valor de pH são uma forma de controlo da sua maior ou menor seletividade (por exemplo ensaios a pH 2,52 e 3,05). As diferenças de massa em alcaloides entre amostras, quer no controlo (Amostras **A** e **E**) quer no ensaio (Amostras **C** e **F**) são representativas do erro do método e encontram-se presentes em todos os ensaios. Servindo estes dados como base, e dado a elevada massa de proteína extraída passou a utilizar-se 2 g de DCMC. Para permitir um tratamento estatístico dos dados os ensaios passaram a ser feitos em triplicado e para cada um destes testou-se a capacidade de recuperação dos compostos adsorvidos, bem

como a sua possível reutilização. Para tal, o polímero utilizado foi colocado sob agitação numa solução de NaCl 1 M de forma a aumentar a força iónica da solução, libertando o que estivesse a ele adsorvido. A mistura foi então tratada como explicado anteriormente para quantificação de alcaloides e proteínas. Para remover o sal presente nas amostras contendo as proteínas estas foram dialisadas o que resultou na remoção não só do sal como também dos alcaloides que apresentam um peso molecular abaixo do *cut-off* da membrana utilizada, pelo que nesta amostra apenas são quantificadas as proteínas em contraste às restantes amostras em que foram quantificada proteínas e alcaloides em conjunto.

Na segunda série de ensaios com a DCMC, comparando a variação de massa entre as amostras **A** e **C** e também entre as amostras **B** e **D** com as mesmas variações da série de ensaios anteriores (49 mg de alcaloides e 81 mg de proteínas removidos no primeiro ensaio a pH 2,5 para 61 mg de alcaloide e 379 mg de proteínas para o mesmo valor de pH) é possível concluir que a quantidade de proteínas e alcaloides adsorvidos aumentou com o aumento da quantidade de DCMC, apesar disto os valores obtidos mostram que ainda não é possível a separação de proteínas e alcaloides. Assim, seguiram-se ensaios a valores de pH mais elevados (6 e 6,5) já que à partida esta variação irá aumentar a seletividade do método já que os alcaloides estão protonados nesta gama de pH, ao passo que as proteínas tendem a estar maioritariamente neutras ou carregadas negativamente.

A recuperação dos compostos adsorvidos não foi alcançada na sua totalidade já que os valores da massa obtidos para as amostras **G** e **H** estão abaixo das variações em proteínas e alcaloides antes apresentados (29 mg de alcaloides e 104 mg de proteínas recuperados de 61 mg e 379 mg, respetivamente, adsorvidos). De forma a verificar se o polímero era reutilizável após o passo de recuperação o sódio presente em cada polímero utilizado nos ensaios, foi quantificado por *ICP-AES* e comparado ao valor obtido para a DCMC não utilizada. Os valores obtidos mostram que a quantidade de sódio diminui em média para metade do valor inicial o que confirma que existem ainda compostos adsorvidos após a tentativa de recuperação. Assim, nestas condições a DCMC não pode ser reutilizada, pelo que nos ensaios de recuperação seguintes a solução utilizada foi de NaCl 2 M de forma a aumentar a força iónica e promover a desadsorção.

A terceira série de ensaios realizados com a DCMC mostram, de forma geral, que esta gama de pH (6 – 6,5) levam a um aumento pouco significativo da adsorção dos alcaloides (adsorção média de 21 mg de alcaloides em contraste à adsorção média de 20 mg para ensaios a valores de pH inferiores). Os valores obtidos estão longe de possibilitar uma separação eficaz de proteínas e alcaloides, mostrando que a DCMC não apresenta *de per si* seletividade suficiente

para cumprir este objetivo. Assim, o desenvolvimento de um polímero desenhado especificamente para adsorver a lupanina emergiu como uma alternativa ao uso da DCMC.

3.3 Ensaios com *MIPs*

Tendo como base a alta especificidade que os *MIPs* apresentam desenvolveu-se um método de síntese de um polímero capaz de adsorver especificamente a lupanina deixando assim todos os outros constituintes da mistura em solução, visto que, a remoção completa da lupanina alcança uma concentração de alcaloides dentro do limite de consumo, já que esta representa cerca de 70% dos alcaloides presentes como foi anteriormente referido.

A síntese de um *MIP* específico para a furosemida, descrito na literatura³⁷, foi ligeiramente adaptado para a preparação do nosso polímero. Assim, começou por se sintetizar DCMC solúvel em água. Para tal seguiu-se o processo de síntese descrito anteriormente utilizando 3 equivalentes de bromomalonato de sódio. O grau de substituição calculado a partir da percentagem de sódio obtida por *ICP-AES* foi de 0,46; valor que está bastante acima dos graus de substituição obtidos nas reações anteriores. Isto é expectável por ter sido utilizado um maior número de equivalentes de bromomalonato de sódio, levando à obtenção de um polímero mais substituído e por isso solúvel em água, permitindo a reação de *cross-linking*.

A banda relativa ao grupo carbonilo a 1610 cm^{-1} no espectro de infravermelho deste polímero é significativamente mais intensa do que a observada nos polímeros anteriores confirmando que o grau de substituição desta DCMC é superior em relação às demais.

A reação de formação do *MIP* inclui o *cross-linking* entre os diferentes grupos carboxilato presentes na DCMC através de uma reação radicalar (Figura 3.4). Esta inicia-se com a rutura homolítica do persulfato que de seguida reage com um dado grupo carboxilato da DCMC, retirando-lhe um eletrão, isto leva a diversas reações de propagação em que o radical formado pode reagir com diferentes entidades do meio como o HEMA, a acrilamida, ou mesmo outro grupo carboxilato, o que leva à formação de uma malha polimérica que rodeia a lupanina presente em solução. A desgaseificação do meio reacional é muito importante para este passo da reação já que o oxigénio presente pode reagir com os radicais formados levando à terminação precoce da reação radicalar.

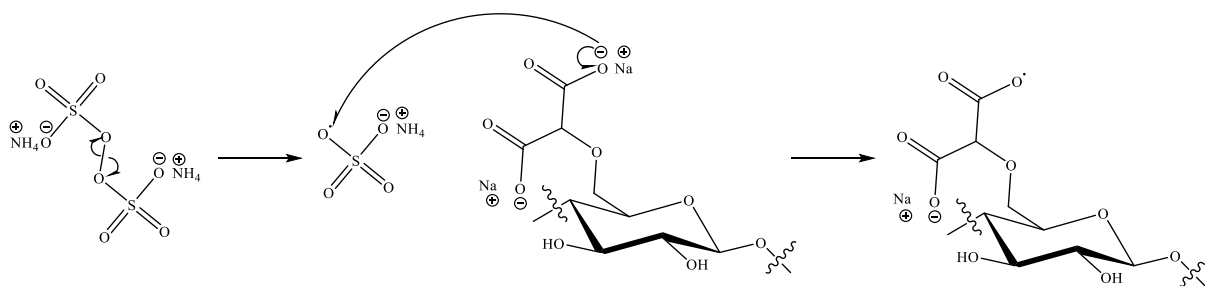


Figura 3. 4 - Mecanismo do início da reação radicalar de *cross-linking* da DCMC.

Após as lavagens para remover restos de matérias de partida e de forma a remover a lupanina das cavidades do *MIP*, este foi deixado num sistema de Soxhlet com acetona durante 24 horas, processo descrito no protocolo utilizado na literatura para a remoção da furosemida³⁷, a acetona foi evaporada e o sólido resultante foi seco e pesado, resultando em 8 mg de um sólido branco. Este valor estava muito abaixo da quantidade de lupanina utilizada na síntese (47,18 mg) pelo que foi feita uma nova extração em sistema de Soxhlet com diclorometano durante 24 horas, após a evaporação do diclorometano não restou qualquer tipo de sólido, pelo que se pode concluir que o diclorometano não permite a remoção da lupanina das cavidades do polímero. Assim, foi feita uma nova extração em sistema de Soxhlet com uma solução aquosa 1 M em ácido acético durante 24 horas, leu-se a absorvância desta solução a 202 nm para verificar a presença de lupanina e concluiu-se que a remoção tinha sido efetiva. O *MIP* foi então macerado para facilitar a remoção da lupanina ainda adsorvida, após o qual o processo de extração com a solução de ácido acético foi repetida. A leitura da absorvância a 202 nm mostrava a presença de lupanina pelo que o *MIP* foi novamente macerado e submetido ao processo de extração. Após todo este processo a absorvância da solução não mostrava a presença de lupanina. Desta forma delineou-se o processo de extração da lupanina para o *scale up* do *MIP*, começando pela maceração do mesmo após o processo de lavagem do polímero, extração em sistema de Soxhlet com a solução aquosa de ácido acético durante 24 horas seguida da lavagem com acetona e secagem do *MIP*.

O espectro de infravermelho obtido para o *MIP* quando comparado com o da DCMC apresenta um forte aumento da intensidade da banda relativa ao grupo carbonilo de ester, não sendo notória a região de 1000 cm⁻¹ devida à vibração das ligações C-O da celulose. Estas alterações são expectáveis já que o HEMA é o composto mais abundante no copolímero produzido aumentando por isso a intensidade relativa das suas bandas.

O primeiro teste de adsorção do *MIP* mostrou que este conseguia uma adsorção de 0,5% em massa de lupanina na sua estrutura, o que está abaixo do valor obtido (7%) com o *MIP* para a furosemida referido anteriormente³⁶. Com o objetivo de obter quantidades significativas de

MIP que permitisse a realização de ensaios semelhantes aos aplicados à DCMC, o passo seguinte consistiu no *scale up* da reação de síntese.

Os primeiros ensaios utilizando 1 g de *MIP* apresentam alterações entre a massa do controlo e após o contacto com o polímero representativas do erro do método, como por exemplo o aumento de massa verificado entre as amostras **A** e **C** de 25,7 mg para 40,6 mg ou **B** e **D** de 744,8 mg para 2815,4 mg para o ensaio a pH 6,58. Contudo, é possível constatar através dos valores calculados no passo de recuperação (Amostras **G**, **H** e **I**), que existe adsorção de proteínas e alcaloides ao contrário do esperado. Uma possível causa será a adsorção das proteínas aos grupos carboxilato que não reagiram na formação do *MIP*. De forma a contornar este problema procedeu-se à síntese de um novo *MIP* e a posterior descarboxilação de uma fração para transformar unidades malonato que não reagiram durante o *cross-linking* das cadeias em unidades acetato com um pKa superior.

A descarboxilação inicia-se com a deslocalização da carga negativa do carboxilato para o grupo carbonilo em beta resultando na libertação do dióxido de carbono que abandona o meio da reação tornando-a irreversível, de seguida o carbonilo é restabelecido com a captação de um protão do meio terminando assim a reação (Figura 3.5).

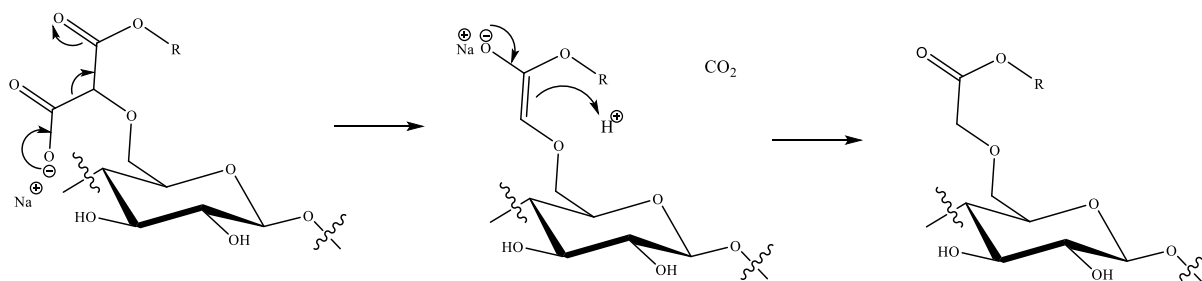


Figura 3. 5 - Mecanismo da reação de descarboxilação do *MIP*.

A comparação dos gráficos da difração de raio-X com o descrito na literatura mostram que o *MIP* apresenta um grau de cristalinidade semelhante a outros tipos de derivados da celulose, contendo por isso parte da cristalinidade que a celulose microcristalina apresenta. É ainda de salientar que a descarboxilação do *MIP* não resulta em diferenças notórias na difração de raios-X.

O decréscimo da intensidade da banda a 1705 cm^{-1} no espectro de infravermelho reflete a redução da concentração de grupos carbonilo na amostra, consequência da reação de descarboxilação, confirmando assim o sucesso da mesma.

A técnica de *ICP-AES*, ao contrário do que seria expectável, mostra um aumento da concentração de sódio entre a *MIP* e o *MIP* descarboxilado, indicando que existem iões de sódio presos na malha do polímero.

O último ensaio foi realizado com 500 mg de *MIP* e a mesma massa do *MIP* descarboxilado. Este ensaio mostra que a descarboxilação do *MIP* melhora de forma significativa a sua especificidade para a adsorção da lupanina, já que com base nos valores da recuperação o *MIP* adsorveu cerca de 1% da sua massa em proteínas e 0,7% em lupanina, ao passo que o *MIP* descarboxilado adsorveu cerca de 0,8% e 1%, respetivamente, mostrando o potencial que este método apresenta na remoção da lupanina.

4. Conclusão

Este projeto teve por base a aplicação de um polímero inovador que apresenta elevado potencial, mas do qual ainda se conhece pouco relativamente a todas as possíveis aplicações que pode vir a ter. Tendo isto em mente, este projeto vem explorar o estabelecimento de um método que possibilite a separação de proteínas e alcaloides do meio de adoçamento do tremço branco, sendo por isso este o principal objetivo. Apesar de não se ter alcançado uma separação completa, os testes realizados mostraram que a DCMC tem de facto uma excelente capacidade de adsorver proteínas. Apesar de não se mostrar satisfatoriamente seletivo para esta aplicação, a criação de um polímero molecularmente impresso específico para a lupanina surgiu como uma alternativa, à partida, bastante viável, de aumentar a especificidade utilizando a DCMC como esqueleto do *MIP*.

O projeto adquiriu assim um segundo objetivo, que incluiu a síntese de um *MIP* específico para a lupanina, partindo da DCMC, por esta via conseguiu alcançar-se este objetivo. Apesar de este novo polímero não apresentar ainda capacidade seletiva suficiente para permitir separar alcaloides e proteínas de forma eficiente, a descarboxilação dos grupos que não reagiram durante a formação do *MIP* mostrou uma melhoria significativa na seletividade do *MIP* para o desempenho desta separação, servindo assim este projeto como base para a construção de um método para a utilização de um *MIP* semelhante para alcançar a separação desejada. A síntese do *MIP* a partir da carboximetilcelulose seria vantajoso já que permitiria a remoção do passo de descarboxilação. A utilização de diferentes monómeros funcionais na síntese do *MIP* seria uma possibilidade para melhorar a seletividade do mesmo.

Bibliografia

1. Huyghe, C. White lupin (*Lupinus albus* L.). *Field Crops Research* **53**, 147–160 (1997).
2. Erbaş, M., Certel, M. & Uslu, M. K. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry* **89**, 341–345 (2005).
3. Carranca, C., Torres, M. O. & Baeta, J. White lupine as a beneficial crop in Southern Europe. I. Potential for N mineralization in lupine amended soil and yield and N₂ fixation by white lupine. *European Journal of Agronomy* **31**, 183–189 (2009).
4. Lupin global production and top producing countries - Tridge. Available at: <https://www.tridge.com/intelligences/lupin-bean/production>. (Accessed: 6th April 2020)
5. Talhinhos, P. & Neves-Martins Helena Oliveira, J. Avaliação da resistência à antracnose em germoplasma de *Lupinus* spp. Evaluation of anthracnose resistance in *Lupinus* spp. germplasm. *550 Rev. Ciências Agrárias* **39**, 550–570 (2016).
6. Salam, M. U. *et al.* Advances in winter pulse pathology research in Australia. *Australasian Plant Pathology. Plant Pathology* **40**, 549–567 (2011).
7. Mohamed, A. A. & Rayas-Duarte, P. *Composition of Lupinus albus. Cereal Chemistry* **72**, (1995).
8. Wink, M., Meißner, C. & Witte, L. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* **38**, 139–153 (1995).
9. Magalhães, S. *et al.* Alkaloids in the valorization of European *Lupinus* spp. seeds crop. *Industrial Crops and Products* **95**, 286–295 (2017).
10. Small, E. 38. Lupins - benefit and harm potentials. *Biodiversity* **13**, 54–64 (2012).
11. Schrenk, D. *et al.* Scientific opinion on the risks for animal and human health related to the presence of quinolizidine alkaloids in feed 2 and food, in particular in lupins and lupin-derived products EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 4 Panel members. */efsajournal EFSA Journal* 20YY (2019).
12. Enneking, D. & Wink, M. Towards the elimination of anti-nutritional factors in grain legumes. in 671–683 (Springer, Dordrecht, 2000).
13. Simeonov, S. P. New synthetic methodologies from biorenewable resources. Doctoral dissertation (Universidade de Lisboa - Faculdade de Farmácia, 2014).
14. Gawali, V. S. *et al.* C2-Modified Sparteine Derivatives Are a New Class of Potentially Long-Acting Sodium Channel Blockers. *ChemMedChem* **12**, 1819–1822 (2017).
15. Maulide, N. WO2014191261A1 - Process for converting lupanine into sparteine - Google Patents. (2013).
16. Wiedemann, M. *et al.* Lupanine improves glucose homeostasis by influencing KATP channels and insulin gene expression. *Molecules* **20**, 19085–19100 (2015).
17. Villalpando-Vargas, F. & Medina-Ceja, L. Sparteine as an anticonvulsant drug: Evidence and possible mechanism of action. *Seizure* **39**, 49–55 (2016).
18. Dewick, P. M. *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. (2009).
19. Gladstones, J. S. *The mediterranean white lupin. Journal of the Department of Agriculture, Western Australia, Series* **4**, (John Sylvester, 1976).
20. Applewhite, T. H. *Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*. (1989).

21. Sathe, S. K., Deshpande, S. S. & Salunkhe, D. K. Functional Properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein Concentrates. *Journal of Food Science* **47**, 491–497 (1982).
22. Raymundo, A., Empis, J. & Sousa, I. White lupin protein isolate as a foaming agent. *Zeitschrift für Leb. -Untersuchung und -forsch.* **207**, 91–96 (1998).
23. Xie, L. L. *et al.* Selective extraction of neutral nitrogen-containing compounds from straight-run diesel feed using polymer-supported ionic liquid moieties. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**, 3973–3977 (2009).
24. Raks, V., Al-Suod, H. & Buszewski, B. Isolation, Separation, and Preconcentration of Biologically Active Compounds from Plant Matrices by Extraction Techniques. *Chromatographia* **81**, 189–202 (2018).
25. Mende, P. & Wink, M. Uptake of the Quinolizidine Alkaloid Lupanine by Protoplasts and Isolated Vacuoles of Suspension-cultured *Lupinus polyphyllus* Cells. Diffusion or Carrier-mediated Transport? *Journal of Plant Physiology* **129**, 229–242 (1987).
26. Lo, B., Kasapis, S. & Farahnaky, A. Lupin protein: Isolation and techno-functional properties, a review. *Food Hydrocolloids* **112**, 106318 (2021).
27. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. & Bohn, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition* **44**, 3358–3393 (2005).
28. Whistler, R. L. & BeMiller, J. N. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition* (Elsevier Inc., 2012).
29. Chagas, R., Gericke, M., Ferreira, R. B., Heinze, T. & Ferreira, L. M. Synthesis and characterization of dicarboxymethyl cellulose. *Cellulose* **27**, 1965–1974 (2019).
30. Chagas, R. Protein haze formation in white wines: from mechanism to resolution. Doctoral dissertation (2017).
31. Morin-Crini, N. & Crini, G. Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Progress in Polymer Science* **38**, 344–368 (2013).
32. Huang-Lee, L. L. H., Cheung, D. T. & Nimni, M. E. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research* **24**, 1185–1201 (1990).
33. Belbruno, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews* **119**, 94–119 (2019).
34. Hu, Z.-H., Wang, Y.-F., Omer, A. M. & Ouyang, X.-K. Fabrication of ofloxacin imprinted polymer on the surface of magnetic carboxylated cellulose nanocrystals for highly selective adsorption of fluoroquinolones from water. *International Journal of Biological Macromolecules* **107**, 453–462 (2018).
35. Wu, J.-H. & He, C.-Y. Advances in Cellulose-Based Sorbents for Extraction of Pollutants in Environmental Samples. *Chromatographia* **82**, 1151–1169 (2019).
36. Fareghi, A. R., Moghadam, P. N., Khalafy, J., Bahram, M. & Moghtader, M. Preparation of a new molecularly imprinted polymer based on self-crosslinkable cellulose acrylate in aqueous solution: A drug delivery system for furosemide. *Journal of Applied Polymer Science* **134**, 45581 (2017).
37. Fareghi, A. R., Moghadam, P. N. & Khalafy, J. Synthesis and characterization of a cellulose-based molecularly imprinted polymer in aqueous solution: The study of Furosemide slow release. *Starch - Stärke* **69**, 1700002 (2017).

38. Kolanoś, R., Wysocka, W. & Brukwicki, T. A comparative study of NMR chemical shifts of sparteine thiolactams and lactams. *Tetrahedron* **59**, 5531–5537 (2003).
39. Wan, D., Wan, R., Haafiz, M. . & Seenii, A. Cellulose phosphate from oil palm biomass as potential biomaterials. *BioResources* **6**, 1719–1740 (2011).
40. SDBSWeb : <https://sdbb.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,19/11/2020). (1999). Available at: <https://sdbb.db.aist.go.jp/sdbb/cgi-bin/landingpage?sdbbno=2569>.
41. Petrucci, R. H., Herring, F. G., Madura, J. D. & Bissonnette, C. *General Chemistry: Principles and Modern Applications, 11th Edition* / Pearson. (Pearson, 2016).

Anexos

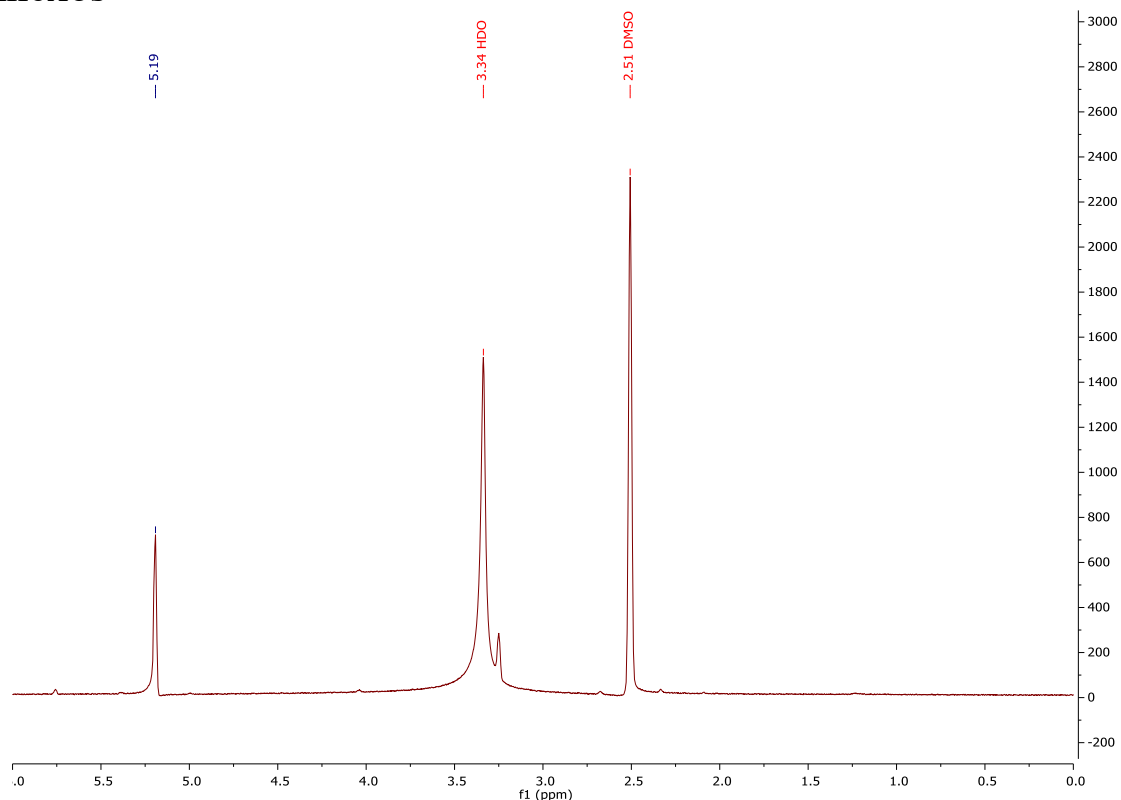


Figura A 1 - Espetro de ^1H RMN do ácido bromomalônico a 400 MHz em DMSO-d_6 .

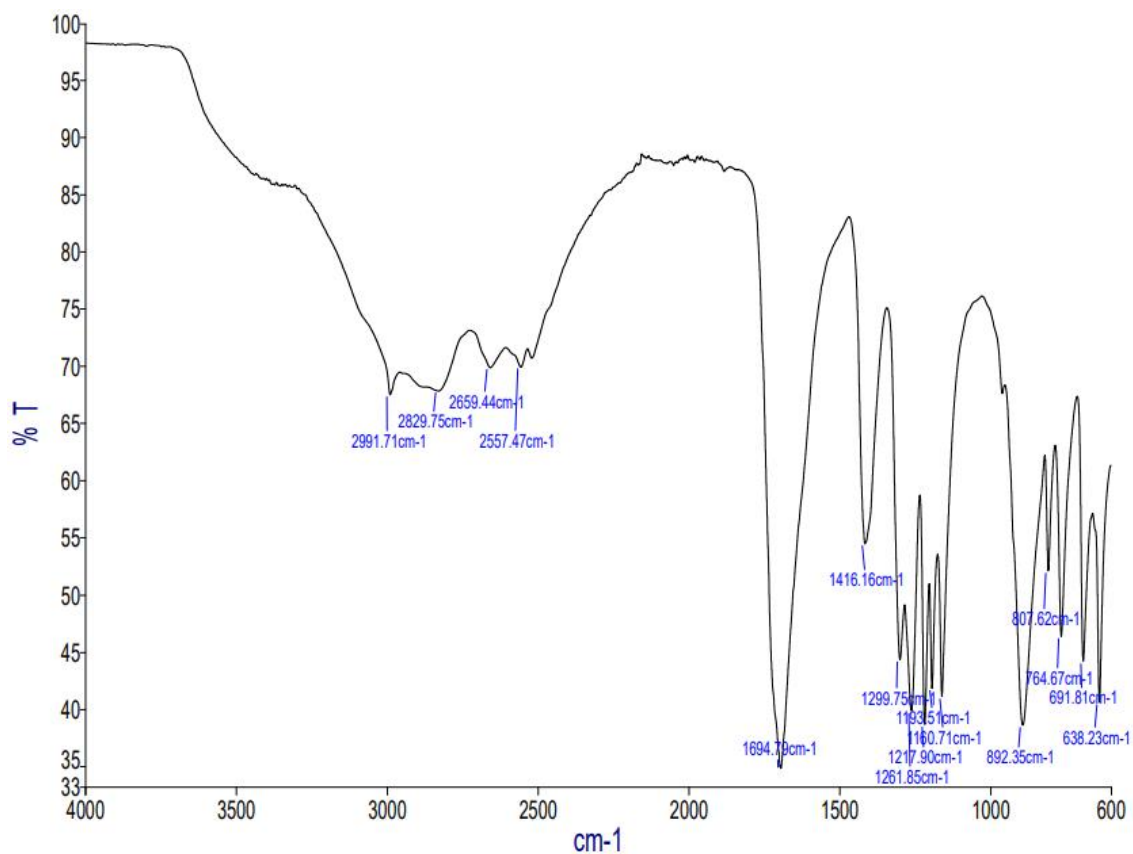


Figura A 2 - Espetro de IV do ácido bromomalônico (ATR).

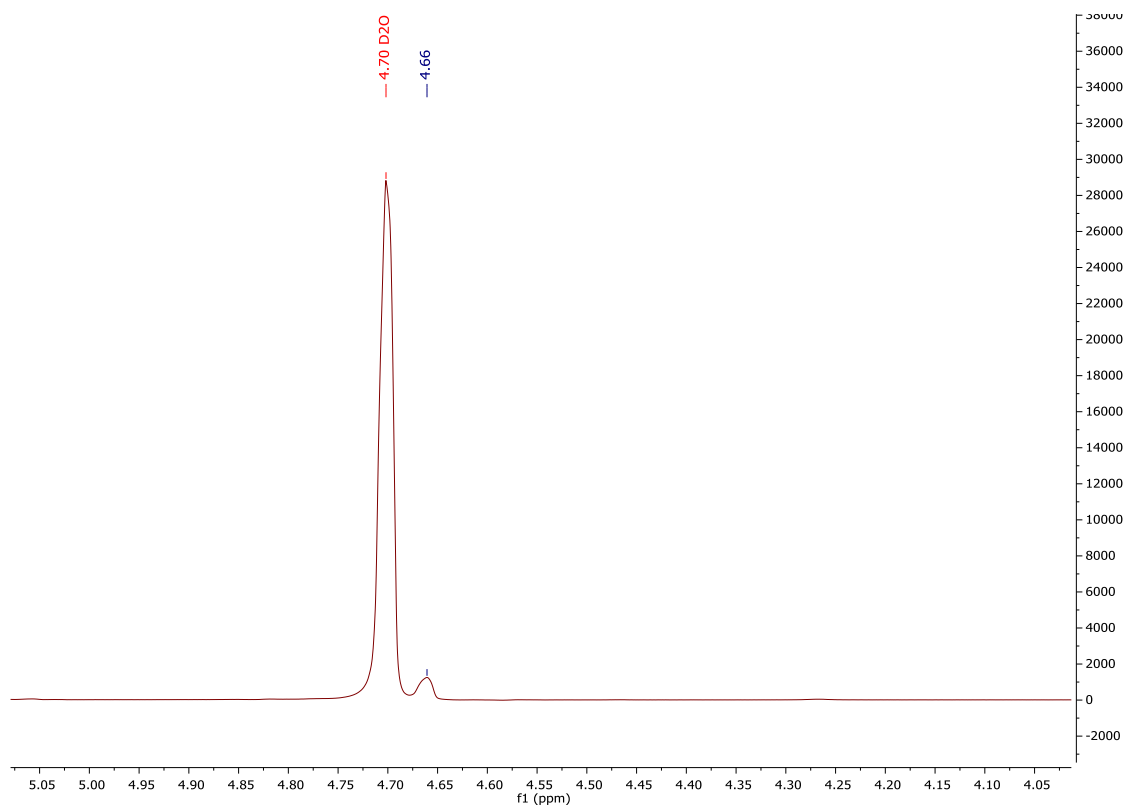


Figura A 3 - Espectro de ^1H RMN do bromomalonato de sódio a 400 MHz em D_2O .

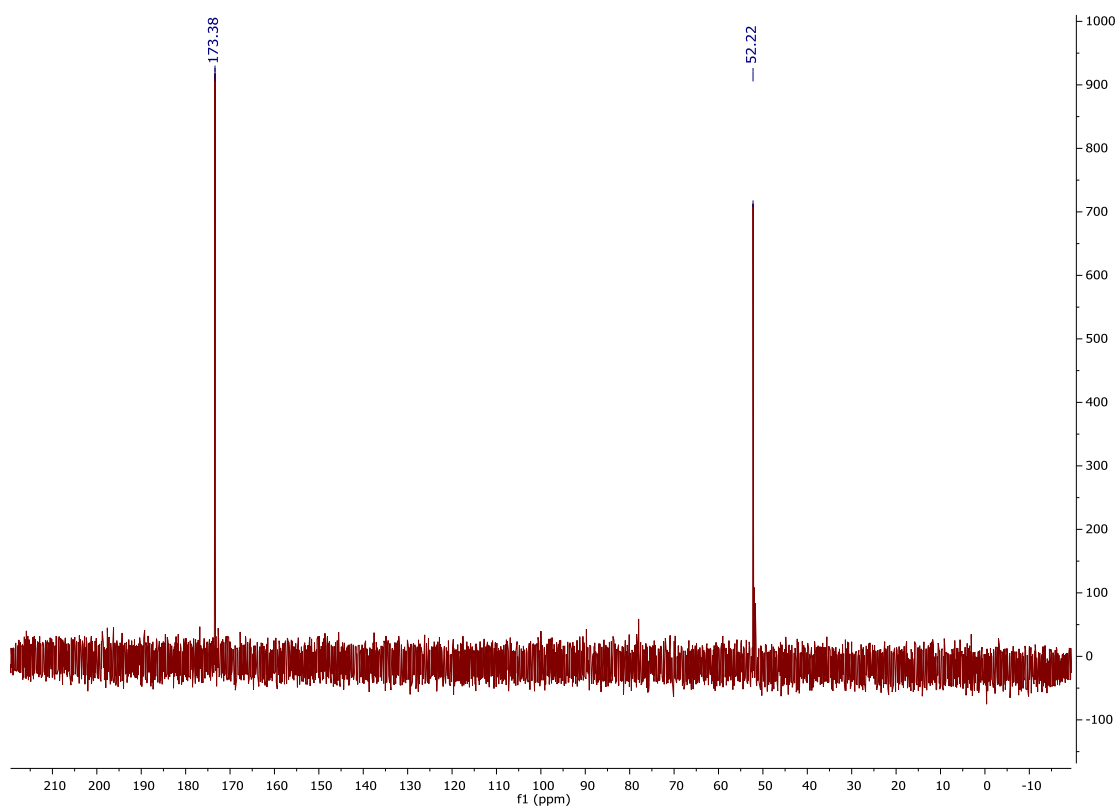


Figura A 4 - Espectro de ^{13}C RMN do bromomalonato de sódio a 400 MHz em D_2O .

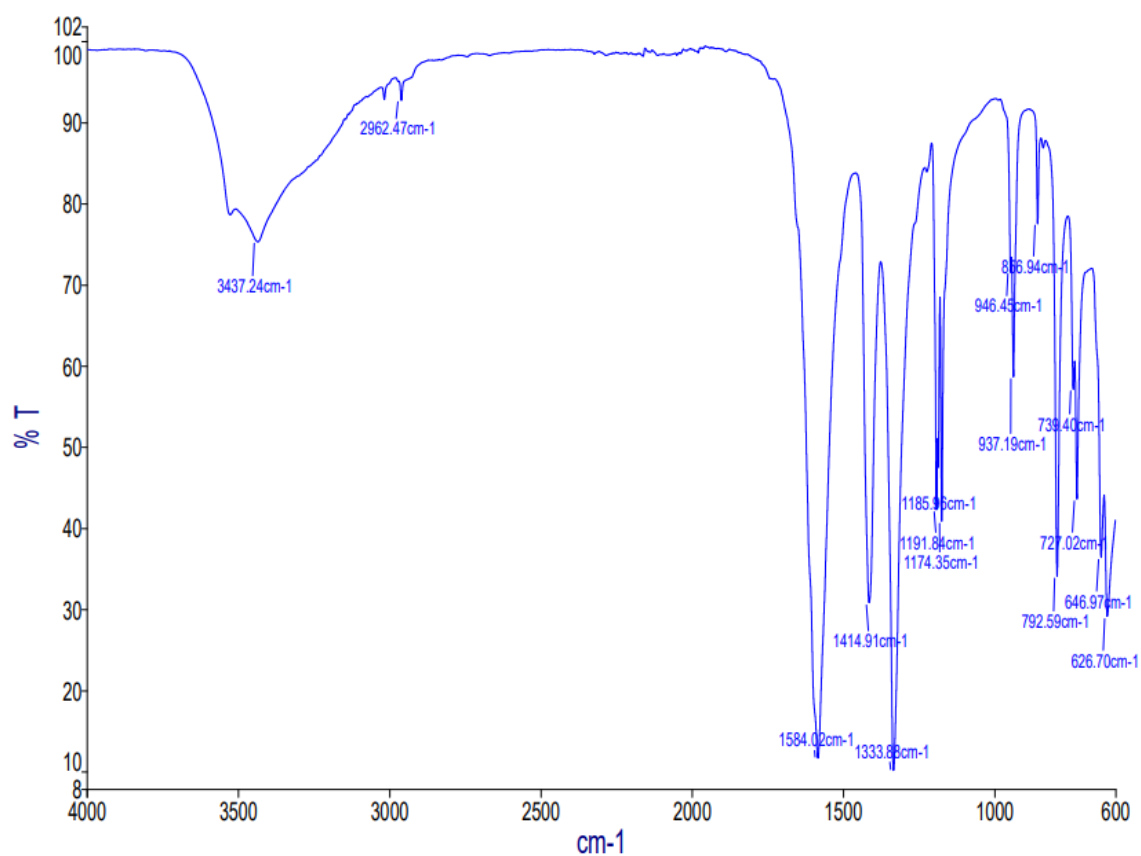


Figura A 5 - Espectro de IV do bromomalonato de sódio (ATR).

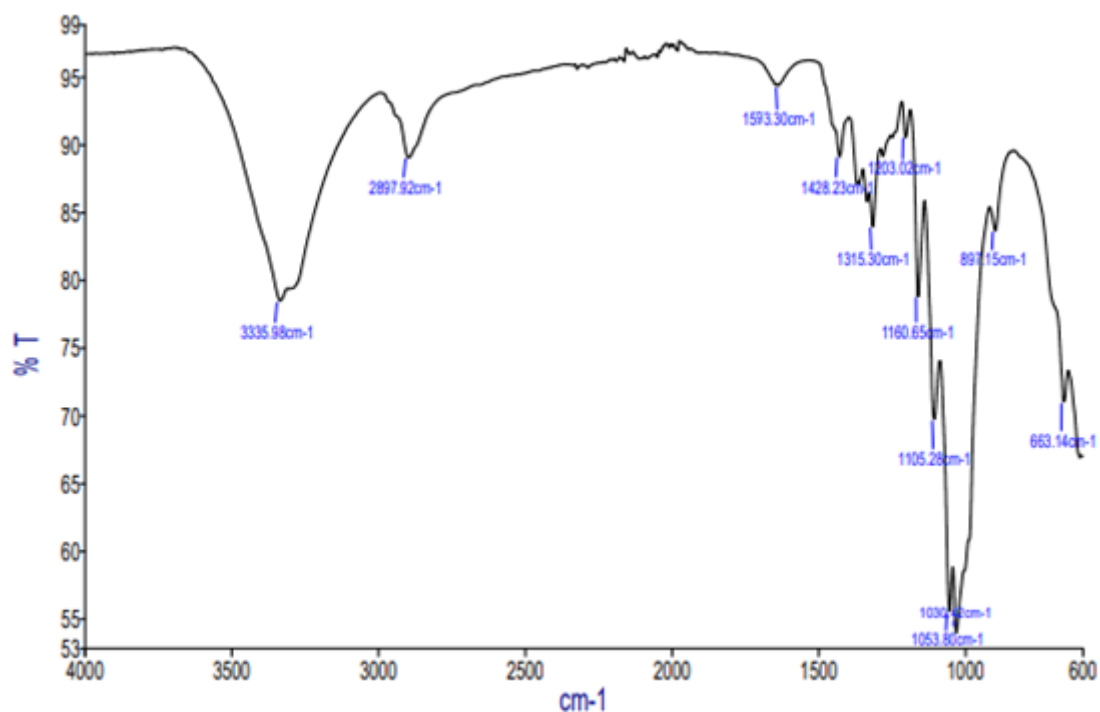


Figura A 6 - Espectro de IV da DCMC (ATR).

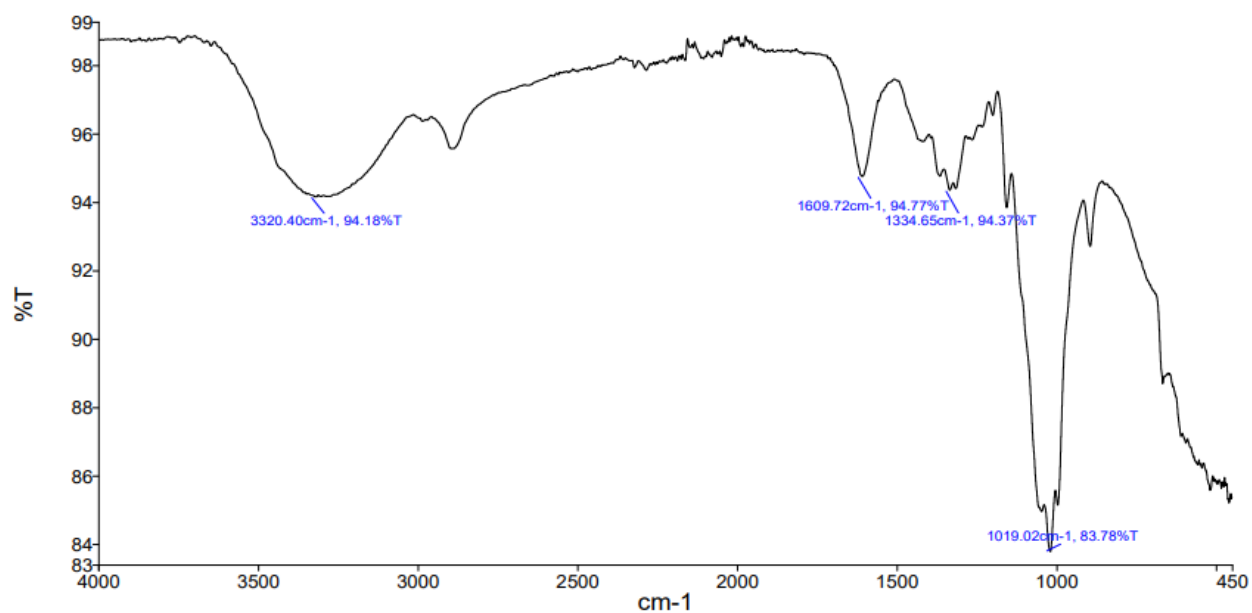


Figura A 7 - Espectro de IV da DCMC (DS=0,46) solúvel em água (reação de 3 equivalentes) (ATR).

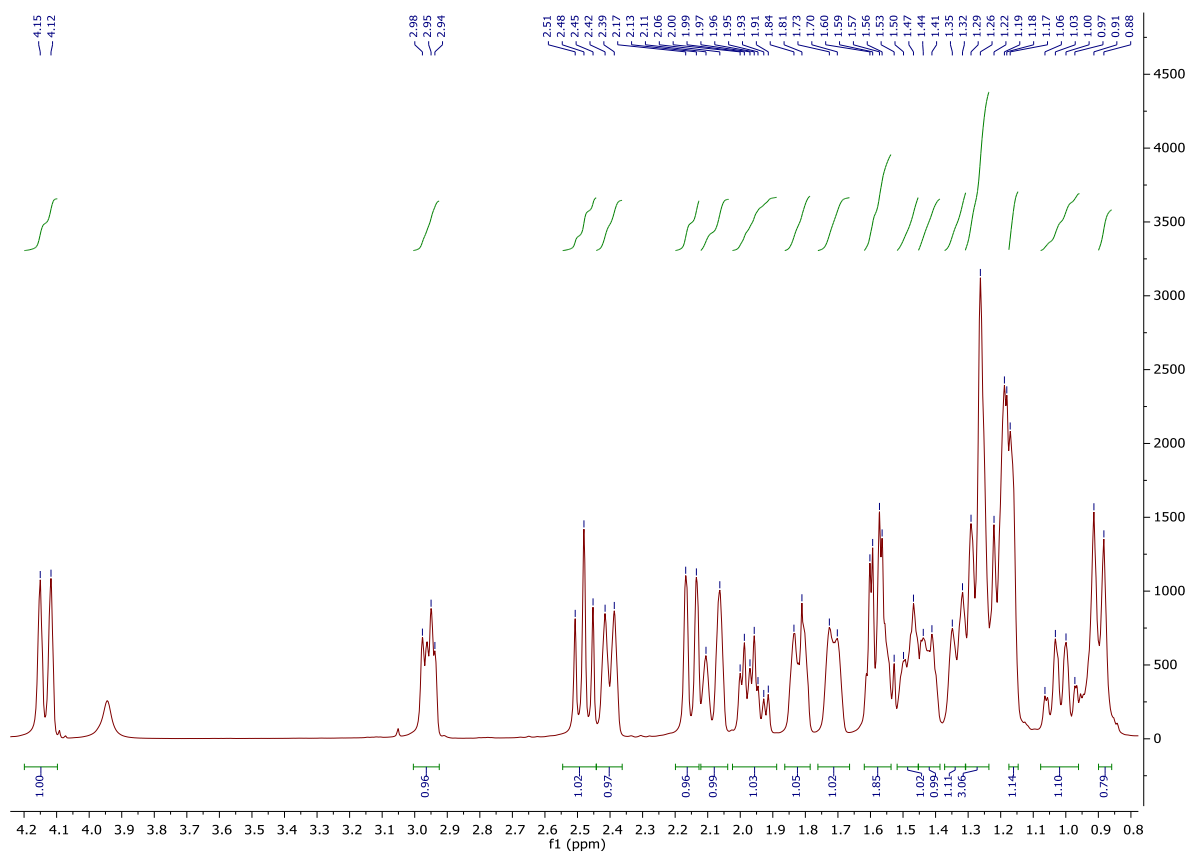


Figura A 8 - Espectro de ¹H RMN da lupanina purificada por coluna cromatográfica a 400 MHz em CDCl₃.

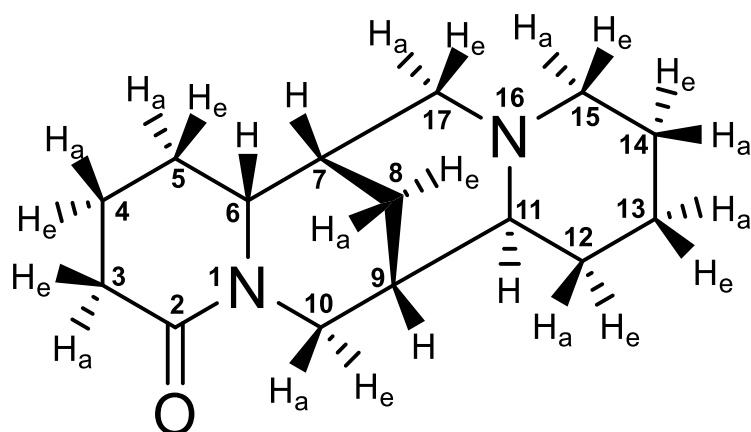


Figura A 9 - Representação estrutural da lupanina, apresentando a numeração utilizada na identificação do espectro de ^1H RMN.

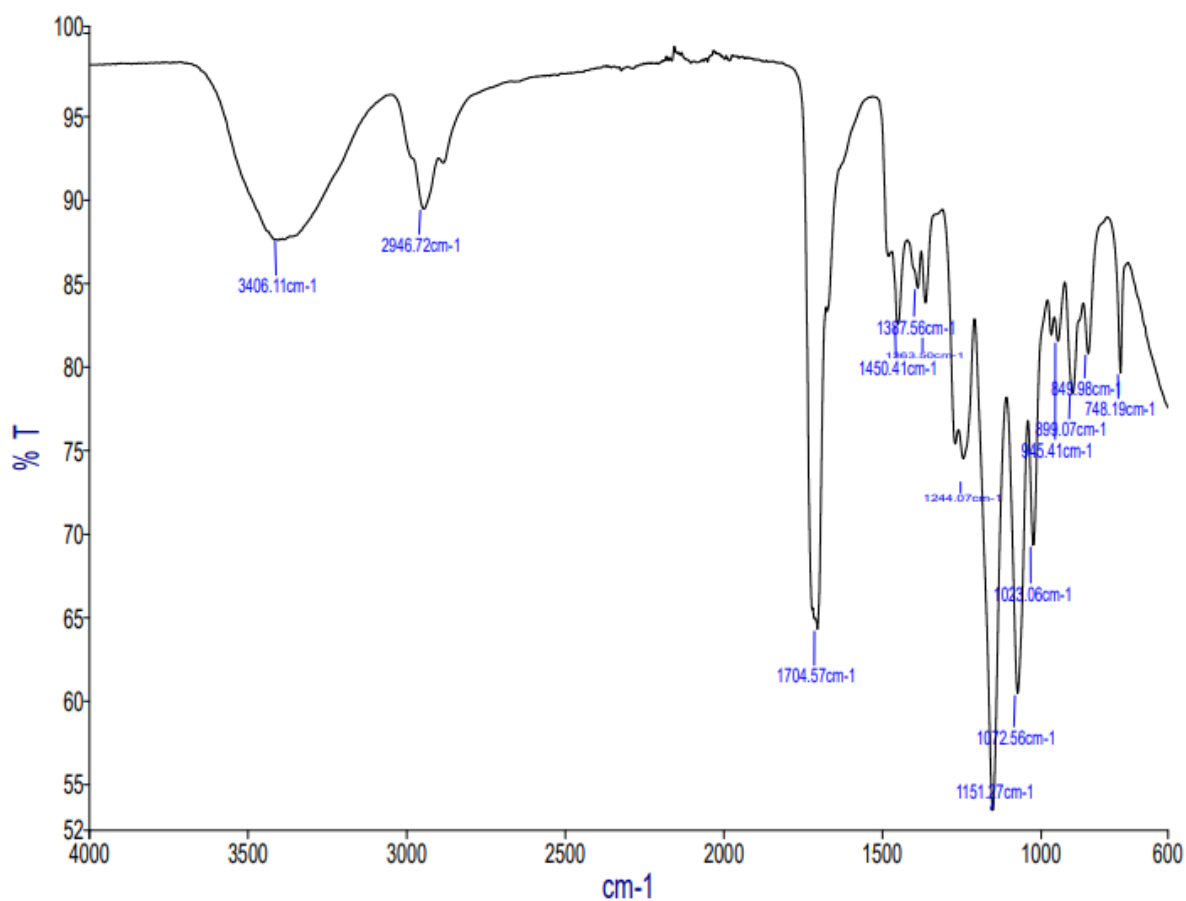


Figura A 10 - Espectro de IV do MIP sintetizado a partir da DCMC (ATR).

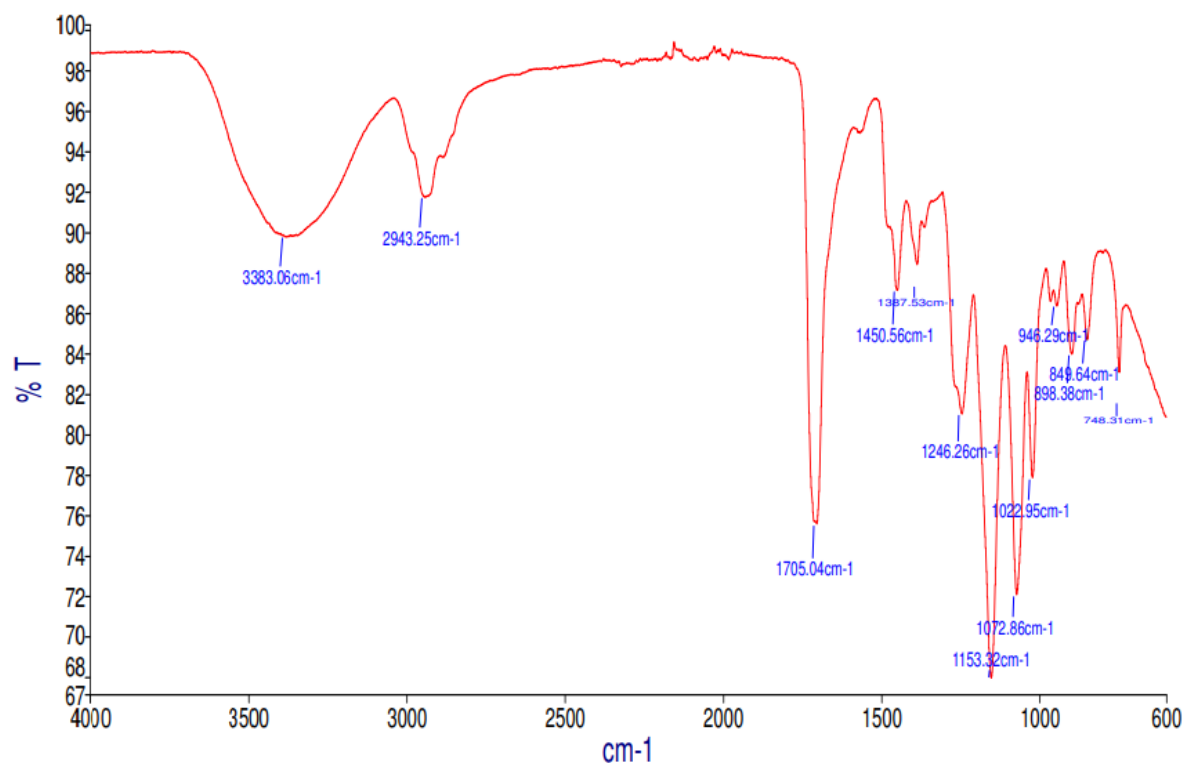


Figura A 11 - Espetro de IV do MIP descarboxilado sintetizado a partir da DCMC (ATR).